

# **PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológiai Doktori Iskola

## **A 16-3 bakteriofág és a *Sinorhizobium meliloti* 41 baktérium közötti felismerés molekuláris elemeinek azonosítása**

**PhD értekezés**

**Deák Veronika**

Témavezető:  
**Dr. Putnoky Péter**  
egyetemi tanár

**PÉCS, 2010.**

## Tartalomjegyzék

<b>Tartalomjegyzék</b>	2
<b>Rövidítések jegyzéke</b>	4
<b>1. Bevezetés</b>	5
<b>2. Irodalmi áttekintés</b>	6
2.1. Fág morfológia, fágfejlődés, genom szerveződés	6
2.2. A <i>Siphoviridae</i> fágfarok szerkezete és összeszerelődése	11
2.2.1. A lambda ( $\lambda$ ) fágfarok szerkezete és összeszerelődése	12
2.2.2. További fágfarok összeszerelődési mechanizmusok: hasonlóságok és eltérések a $\lambda$ fágtól	14
2.3. A farokkal rendelkező fágok kapcsolódása a baktérium fágreceptorával	17
2.4. Bakteriofág receptorok típusai	18
2.4.1. Fehérje természetű fágreceptorok	18
2.4.2. Többféle molekulatípusból álló fágreceptorok	22
2.4.3. Poliszacharid jellegű fágreceptorok	23
2.5. A 16-3 fág mint a legrészletesebben tanulmányozott rhizobium fág	25
2.6. A <i>S. meliloti</i> sejtfelszíni poliszacharidjai	27
<b>3. A munka előzményei</b>	31
<b>4. Célkitűzések</b>	33
<b>5. Anyagok és módszerek</b>	34
5.1. Baktériumok, bakteriofágok, plazmidok	34
5.2. A baktériumok növesztése	37
5.3. Plazmid DNS bejuttatása baktérium sejtekbe	37
5.3.1. Konjugáció	37
5.3.2. Kompetens sejt készítése és transzformálása	37
5.4. Fágok szaporítása, fágtitrálás	38
5.5. Fágérzékenységi teszt	38
5.6. Fágkötési teszt	39
5.7. Hőmérséklet-érzékenységi ( <i>shift up/shift down</i> ) kísérletek	39
5.8. <i>Marker rescue</i> kísérletek	39
5.9. Fágrészecskék tisztítása	39
5.10. Fágrészecskék elektronmikroszkópos vizsgálata	41
5.11. Plazmid DNS izolálás	41
5.12. Fág DNS izolálás	42
5.13. Emésztés restriktációs endonukleázokkal, ragados végek feltöltése	42
5.14. Agaróz gélelektroforézis	43
5.15. DNS fragmentek izolálása agaróz gélből	43
5.16. Ligálási reakció	43
5.17. Polimeráz láncreakció (PCR, <i>polimerase chain reaction</i> )	44
5.18. DNS-szekvencia meghatározás	46
5.19. <i>In vitro</i> transzpozonozás és kanamicin kazettás mutagenézis	46

5.20.	<i>16-3</i> inszerciós fágmutánsok létrehozása	48
5.21.	Fehérjék elválasztása MOPS-SDS poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazásával	49
5.22.	Western blot és N-terminális aminosavsorrend meghatározás	49
5.23.	KPS-LPS preparálás és elválasztás DOC poliakrilamid gélelektroforézissel	50
5.24.	Bioinformatikai eszközök	51
<b>6.</b>	<b>Kutatási eredmények</b>	52
6.1.	Spontán receptorhibás baktériumok és <i>host range</i> fágmutánsok izolálása	52
6.2.	A fágreceptor mutáns baktériumok sérültek a K <sub>R5</sub> antigén termelésben	54
6.3.	A receptormutációk az <i>rkpM</i> , <i>rkpZ</i> és <i>rkpY</i> géneket érintik	55
6.4.	A fágreceptor kialakításában részt vesz az RkpM és az RkpY fehérje	57
6.5.	A <i>host range</i> fágmutánsok jellemzése	59
6.5.1.	A <i>h5</i> , <i>h105</i> , <i>h842</i> <i>host range</i> mutációk azonosítása: a <i>hI</i> gén részt vesz a baktériumfelszín felismerésében	59
6.5.2.	A <i>h109</i> , <i>h843</i> és a <i>h182</i> <i>host range</i> mutációk azonosítása: a <i>hII</i> gén részt vesz a baktériumfelszín felismerésében	62
6.6.	A <i>hII</i> gén farki struktúrfehérjét kódol	64
6.7.	A HII fehérje esszenciális a fágfejlődés késői szakaszában	65
6.8.	A <i>16-3</i> fág kései génrégiójának célzott mutagenézise	67
6.9.	Az inszerciók hatására fertőzőképes fágreszecskét nem tartalmazó lizátumok jönnek létre	70
6.10.	Az elrontott <i>orf</i> -ek mindegyike funkcionáló gént takar	71
6.11.	Az inszerciók többsége a vad típusú fágnál nagyobb sűrűségű struktúrák összeépülését okozza	72
6.12.	Az inszerciós mutánsok agaróz gélben a vad típusnál gyorsabban vándorolnak	73
6.13.	Az <i>orf017</i> , <i>orf018a</i> , <i>orf020</i> , <i>orf021</i> , <i>orf022</i> ( <i>hI</i> ), <i>orf023</i> ( <i>hII</i> ) gének termékei esszenciálisak a <i>16-3</i> fágfarok felépítésében	74
<b>7.</b>	<b>Az eredmények megvitatása</b>	77
<b>8.</b>	<b>Összefoglalás</b>	83
<b>9.</b>	<b>Summary</b>	84
<b>10.</b>	<b>Mellékletek</b>	85
	1. melléklet A vizsgált <i>16-3</i> gének és az általuk kódolt fehérjék szekvenciája	85
	2. melléklet Elektronmikroszkópos felvételek a <i>16-3</i> vad és néhány inszerciós mutáns fágról	89
<b>11.</b>	<b>Irodalmi hivatkozások</b>	92
<b>12.</b>	<b>Publikációk</b>	99
	Köszönetnyilvánítás	100

## Rövidítések jegyzéke:

AC	accession number
Amp	ampicillin
bp	bázispár
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
cfu	telepképző egység (colony forming unit)
DOC	deoxikólsav (deoxycholic acid)
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EPS	exopoliszacharid
HMW	nagy molekula tömegű (high molecular weight)
kb	kilobázispár
Km	kanamicin
Kdo	keto-deoxy-oktulozonsav
KPS	kapszuláris poliszacharid
LMW	alacsony molekula tömegű (low molecular weight)
LPS	lipopoliszacharid
nt	nukleotid
orf	nyitott leolvasási keret (open reading frame)
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PCR	polimeráz láncreakció
pfu	plakk-képző egység (plaque forming unit)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát (sodium dodecyl sulphate)
Spc	spectinomycin
Sm	streptomycin
Tc	tetraciklin
TEMED	N,N,N'N' tetrametilén-diamin
Tris	tris-(hidroxi-metil)-amino-metán



## 1. BEVEZETÉS

A biológiai struktúrák közötti felismerési folyamatok molekuláris szintű megismerése mindig az érdeklődés középpontjában állt, legyen szó szimbiotikus vagy patogén kapcsolat kialakulásáról. Magyarországon a szimbiotikus nitrogénkötés kutatásnak – melynek legismertebb modellrendszere a takarmánylucerna (*Medicago sativa*) és annak szimbiotikus nitrogénkötő partnere, a *Sinorhizobium meliloti* (korábbi nevén *Rhizobium meliloti*) baktériumfaj hazai izolátuma, az Rm41 törzs – komoly hagyományai vannak. Az 1960-as évek elején talajból izolálták a *S. meliloti* Rm41 baktérium törzsspecifikus bakteriofágját, a 16-3 fágot. A 16-3 fág a rhizobium genetika meghatározó eszközévé vált, és az elmúlt évtizedek alatt összegyűlt ismeretanyag révén a legintenzívebben tanulmányozott rhizobium fágként ismert a szakirodalomban. Mint modellszervezet, a 16-3 fág kutatása számos alapvető fágfejlődési/szabályozási mechanizmus feltárásához vezetett.

Az elmúlt évek kutatásai ráirányították a figyelmet arra, hogy a baktérium-növény és a baktérium-fág felismerésben közös molekuláris elemek játszhatnak szerepet a rhizobiumokban, ugyanis a növényi szimbiózis kezdő lépéseinek (specifikus felismerés) kialakításában hibás baktérium mutánsok egy részénél a baktérium-fág felismerés is sérült. Mivel ez egy ismeretlen terület volt – annak ellenére, hogy bizonyos munkákban a 16-3 fágot használták a szimbiózis kialakítására képtelen nagyszámú baktérium mutáns gyors izolálására –, célul tűztük ki a *S. meliloti* Rm41 baktérium és a 16-3 bakteriofág közötti felismerésben szerepet játszó kulcsfontosságú elemek azonosítását. Ennek érdekében fágreceptor hibás baktérium mutánsok, valamint a megváltozott receptorhoz alkalmazkodni képes ún. gazdaspecifitási (*host range*) fágmutánsok izolálását és vizsgálatát végeztük klasszikus genetikai és molekuláris biológiai eszközökkel. Ez a rendszer mind a baktérium, mind pedig a fág oldaláról lehetőséget nyújtott a felismerési folyamat vizsgálatára. Továbbá, reverz genetikai megközelítéssel, célzott mutációk létrehozásával feltérképeztük a baktériumfelszín felismeréséért felelős fágfarok felépítésében szerepet játszó gének egy részét. Eredményeink, a rhizobium kutatáson túlmenően, hozzájárulhatnak a baktérium-bakteriofág fertőzés folyamatának, a fágok és más vírusok nagyfokú alkalmazkodó képességének, a fágok összeszerelődési mechanizmusának és evolúciójának megértéséhez.

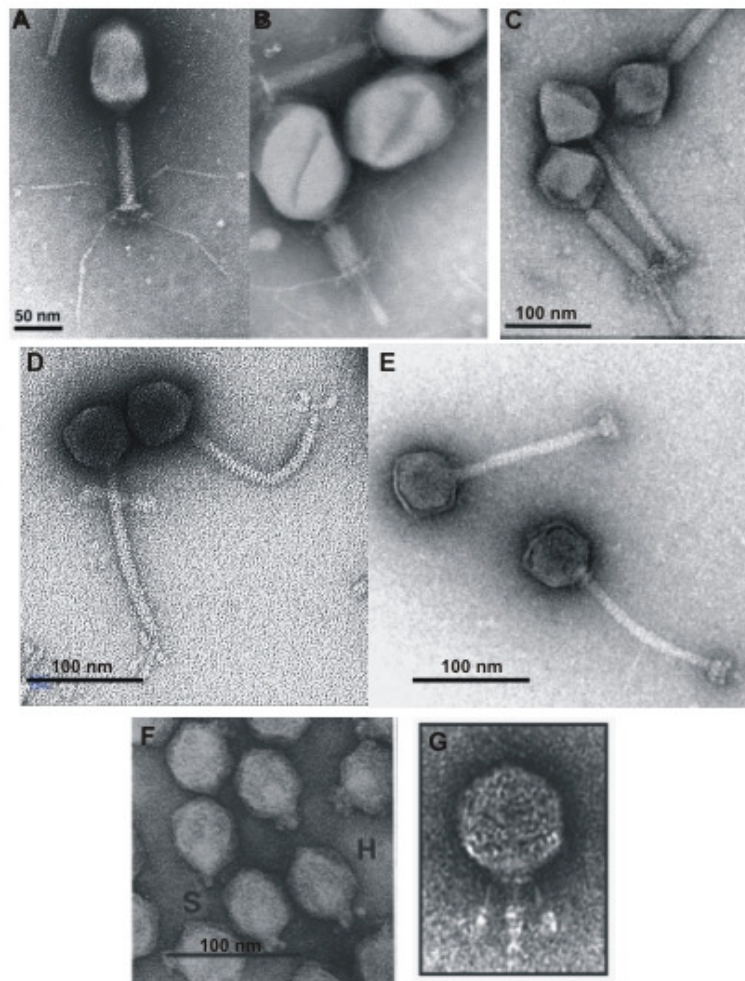
## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A bakteriális vírusokról szóló első megfigyelés 1896-ból származik, amikor is Ernest Hankin feljegyezte, hogy a Ganges és Jumna folyók vize antibakteriális aktivitással rendelkezik *Vibrio cholerae* kórokozóval szemben. Az antibakteriális ágens finom porcelánszűrőn átjut, aktivitása forralással megszűnik. 1915-ben Frederik William Twort beszámolt arról, hogy baktérium tenyészeit nagyon kicsi, láthatatlan ágensek pusztítják. Felvetette, hogy ezek az ágensek vírusok, amelyek a baktériumok parazitái lehetnek. Két évvel később Felix d'Herelle újra felfedezte a jelenséget, és a fertőző ágenseknek a bakteriofág nevet adta (görög: *phagein* = felfalni). Az első kísérletek a bakteriofágok mint antibakteriális szervezetek terápiás felhasználhatóságára irányultak, ám a kezdeti nem megfelelően kontrollált kísérletek, majd az antibiotikumok felfedezése és eredményes hatása döntő érveként szolgált a fágterápia elvetésére. A fágkutatás új korszakát Max Delbrück és Salvador Luria indították el 1938-ban; ezzel a biológiai kutatásban kezdetét vette a fágok modellként való alkalmazása. Ez a felhasználás a modern biológiai kutatás kiemelkedő eredményeihez vezetett. Alfred Hershey és Martha Chase 1952-ben T2 faggal végzett kísérleteikben bizonyították, hogy a DNS az egyedüli és elégséges genetikai kódhordozó. További számos alapvető biológiai folyamat, mint a replikáció, transzkripció, rekombináció, génszabályozás mechanizmusainak megismerése nagyrészt a fágok vizsgálata során teljessé vált ki. A fágok mára a molekuláris biológia eszköztárának is fontos elemei. Ökológiai jelentőségük a baktérium genomok evolúciójában, a gazdasejt szerotípusának és patogenitásának megváltoztatásában, a baktériumpopulációk méretének szabályozásában meghatározó. A fágkutatás ma reneszánszát éli, elsősorban a gazdaságilag fontos és – a fágterápia lehetőségének újraértékelése okán – a patogén baktériumok fágjainak jut kitüntetett szerep a tudományos kutatásban. Mint nanomolekuláris gépezetek, az utóbbi időben a fágok a biofizika területén is közkedvelt modellek.

### 2.1. Fág morfológia, fágfejlődés, genom szerveződés

A bakteriofágok legnépesebb csoportját (kb. 95%-át) a farokkal rendelkező fágok alkotják (*Caudovirales* rend). Becslések szerint ez kb.  $10^8$  fajt jelent (Brussow and Hendrix, 2002). Nem meglepő, hogy a bakteriofágok e csoportjáról rendelkezünk a legtöbb ismerettel. A farok szerkezete, morfológiája alapján a *Caudovirales* rend három nagy családra tagolódik: *Myoviridae* (kontraktilis farok), *Siphoviridae* (hosszú, nem kontraktilis farok) és *Podoviridae* (rövid, nem kontraktilis farok) (1. ábra). A fágfarok funkciója az, hogy kihorgonyozza a

fágrészecskét a baktérium felszínén, és elősegítse a fág DNS bejutását a sejtbe (Plisson *et al.*, 2007).

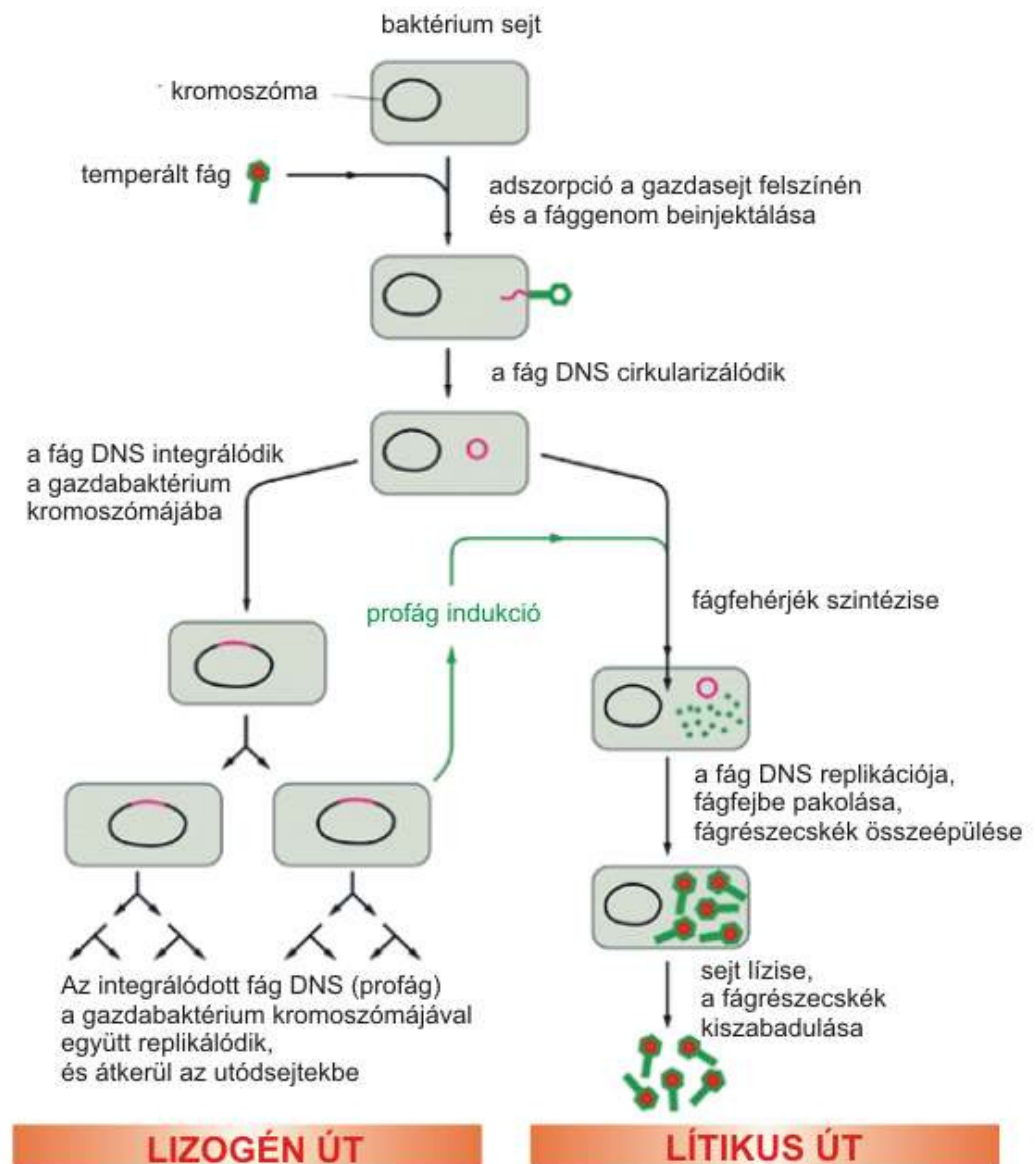


**1. ábra: A farokkal rendelkező fágok (*Caudovirales*) néhány reprezentánsa**

- Myoviridae*    **A, B:** T4 colifág (Miller *et al.*, 2003)  
                   **C:** LP65 lactobacillus fág (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004)  
*Siphoviridae*: **D:** Rtp colifág (Wietzorrek *et al.*, 2006)  
                   **E:** TP901-1 lactococcus fág (Vegge *et al.*, 2005)  
*Podoviridae*: **F:** K1F colifág (Petter and Vimr, 1993)  
                   **G:** C1 streptococcus fág (Nelson *et al.*, 2003)

A fágok baktériumsejtek intracelluláris parazitái. Életciklusukat tekintve kétfélék lehetnek: virulens és temperált (mérsékelt) fágok. A virulens fágok csakis ún. lítikus fejlődésre képesek, melynek fő lépései: a fággenom bejutása a baktériumsejtbe, a fággenom replikációja – baktériumkromoszóma degradálódása, fág struktúrfehérjék szintézise, összeszerelődés és a fágrészecskék kiszabadulása a sejtől (2. ábra). A temperált fágok szaporodásuk során a lítikus cikluson kívül ún. lizogén fázisba kerülhetnek, amikor is a baktériumsejtbe jutott fággenom – a gazdasejt DNS replikációjának leállítását, illetve a sejt

lízise nélkül – ún. profágként beépül a baktérium kromoszómájába, vagy nem integrálódott plazmid formában van jelen a sejtben. A lizogén állapot fenntartásáért a profág által kódolt represszor fehérje felelős, a lítikus fejlődéshez szükséges fággenek transzkripciójának gátlása által. Bizonyos sejtfiziológiai hatásokra a represszió megszűnhet (profág indukció), és megindulhat a fág lítikus fejlődése (2. ábra) (Oppenheim *et al.*, 2005).



**2 ábra: Egy temperált fág életciklusának bemutatása**

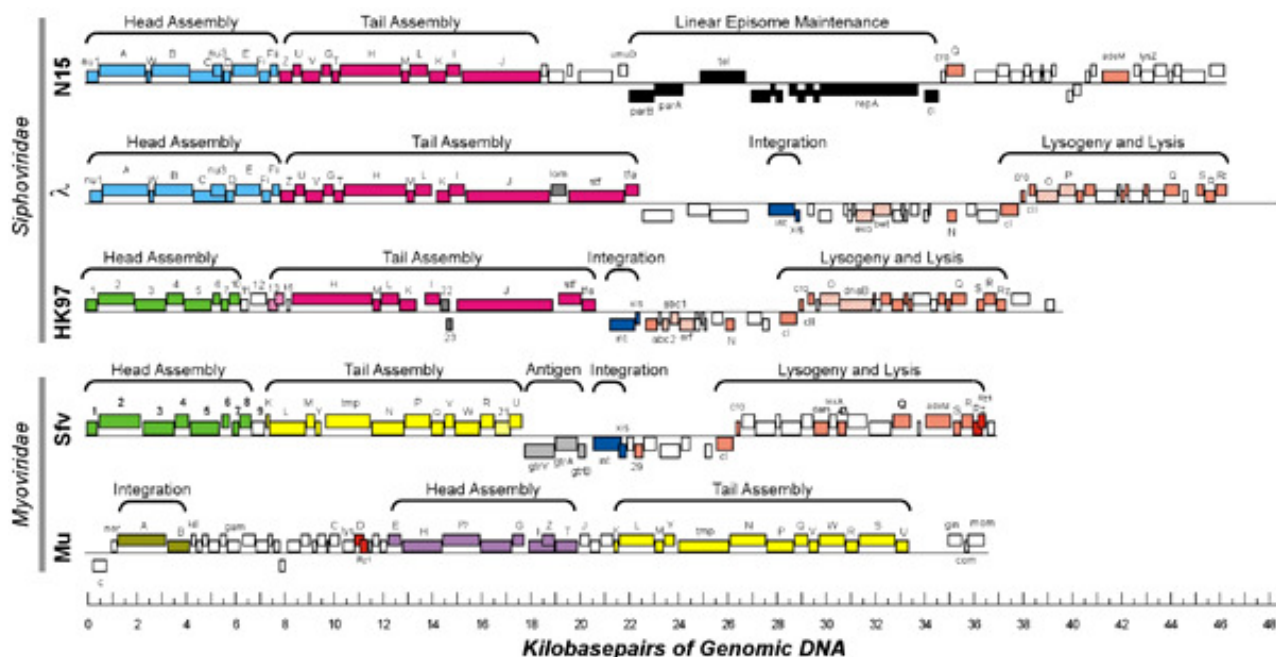
(forrás: [http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/bact\\_Lambda.html](http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/bact_Lambda.html), módosítva)

Mind a lítikus, mind a lizogén úton való fejlődés háttérében kifinomult időbeli génexpressziós szabályozás áll. A fejlődés egy meghatározott idejében szükséges gének a

genomban csoportokba rendeződnek. Az átíródás idejét tekintve a fággenom tipikusan korai és kései génekre osztható. A korai régió a lizogénia kialakulásában és fenntartásában, illetve a lítikus fejlődésben szerepet játszó géneket tartalmazza. A kései gének a fágreszecske összeszereléséhez és a sejt líziséhez szükséges fehérjéket kódolják (Oppenheim *et al.*, 2005).

A farokkal rendelkező fágok genomja duplaszálú DNS molekula. Mára már rutinszerűen határozzák meg egy-egy fág teljes genom szekvenciáját. Az egyre növekvő adathalmaz lehetővé teszi a genomszintű összehasonlításokat. A farokkal rendelkező fágok minimális genommérete 20 kb körüli, ez magába foglalja a DNS pakolásban, fej, farok, farki rost kialakításában, a DNS replikációjában, transzkripció regulációjában és a lízisben szerepet játszó géneket. Míg a gének, géncsoportok sorrendje (géntérkép) szigorúan konzervált (3. ábra) (az egyazon gazdán növekedő, de különböző taxonómiai csoportba tartozó, vagy távoli rokon baktériumokra specifikus, de közeli csoportba tartozó fágokat tekintve), addig maga a DNS szekvencia és a hasonló funkciót betöltő fehérjék aminosavsorrendje általában igen gyenge hasonlóságot mutat (Lucchini *et al.*, 1998). A látszólagos ellentmondás feloldódni látszik annak ismeretében, hogy a szekvenciaszinten eltérő fágfehérjék igen hasonló másodlagos szerkezettel, sőt azonos proteolitikus hasítási hellyel rendelkezhetnek. Mindez egyrészt a fágok ősi divergenciájára, másrészt szembetűnő evolúciós konvergenciájára utal (Brussow and Hendrix, 2002). A genomszintű összehasonlítások további fontos megállapítása a fággenomok mozaikos (kiméra) jellege (3. ábra). Egyedi gének, vagy akár egy funkcionális egységbe tartozó géncsoportok (ún. modulok) horizontális terjedése, keveredése általános a fágok körében.

A génmodulok közötti rövid, magas konzerváltságot mutató DNS szekvenciák jelenlétére is felfigyeltek már; ezeknek szerepük lehet a rekombináció útján történő genomátrendeződésekben, modulok kicserélődésében (Brussow and Hendrix, 2002). Nukleinsav homológia vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a fággenomok tartalmazhatnak bakteriális eredetű (elsősorban plazmid és transzpozon) szakaszokat, vagy akár a gazdabaktérium által fertőzött eukarióta sejtől származó szekvenciákat (Ackermann *et al.*, 1995).



### 3. ábra: Fágok konzerválódott géntérképének és a genomok mozaikos jellegének szemléltetése

Öt colifág géntérképének összehasonlítása jól szemlélteti a fágokban az egyes funkciókat betöltő géncsoportok konzervált elrendeződését, az egyes géncsoportokon belül pedig a gének közel azonos számát.

(forrás: Pittsburg Egyetem <http://www.pitt.edu/~biohome/Dept/Frame/phagephylogeny.htm>)

A nagyfokú mozaicitásból adódóan a fágok leszármazásának nyomon követése hagyományos filogenetikai módszerekkel igen nehézkes (Brussow and Hendrix, 2002). Ebből adódik, hogy a fágok taxonómiai rendszerezése ezidáig elsősorban morfológiai szempontok és a nukleinsav típusa (DNS vagy RNS, egyszálú – ss vagy kétszálú – ds) szerint történt. A *Lactococcus lactis* gazdaságilag fontos (tejipar) baktérium fágjai az egyik legintenzívebben kutatott csoport. 14 lactococcus fág teljes genomszekvenciájának összehasonlítása, valamint DNS-DNS hibridizáción és PCR technikákon alapuló módszerek alkalmazása a lactococcus fágok további csoportokba (936, c2, P335 stb.) való sorolását teszik lehetővé a *Siphoviridae* családon belül (Deveau *et al.*, 2006).

Glazko és munkatársai 158 darab dsDNS fág genom (2005-ben a szekvenciaadatbázisokban fellelhető összes genom) filogenetikai elemzését végezte el (Glazko *et al.*, 2007). Összesen 803 gén jelenlétét/hiányát vizsgálták, és a génösszetétel alapján 18 csoportot különítettek el, valamint 294 horizontális géntranszfer eseményt valószínűsítettek az egyes fágok között (4. ábra).

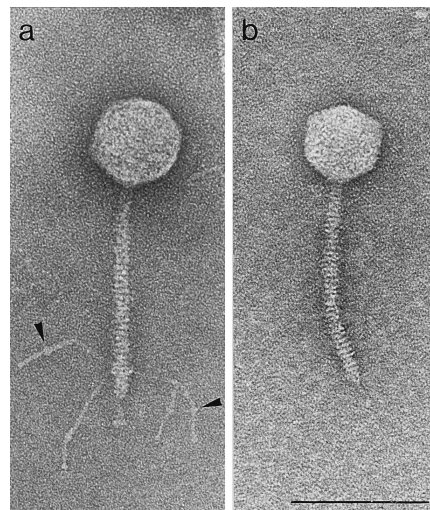




fehérjék). A makromolekulák önszerveződő összeszerelődésének egyik legszebb, részleteiben jól ismert modellje az *E. coli*  $\lambda$  fág farok felépülés mechanizmusa. Az utóbbi években más fágok esetén is igazolták a  $\lambda$  fágnál leírt alapvető törvényszerűségeket. A *Siphoviridae* farok szerkezeti elemeit és az összeszerelődés mechanizmusát az alábbiakban néhány részletesen tanulmányozott fág példáján keresztül mutatom be.

### 2.2.1. A lambda ( $\lambda$ ) fágfarok szerkezete és összeszerelődése

A  $\lambda$  bakteriofág farki része egy olyan flexibilis csőhöz hasonlít, mely kúp alakú struktúrában végződik. Ehhez egy központi farki rost és - bizonyos izolátumoknál - oldalrostok kapcsolódnak (5. ábra).



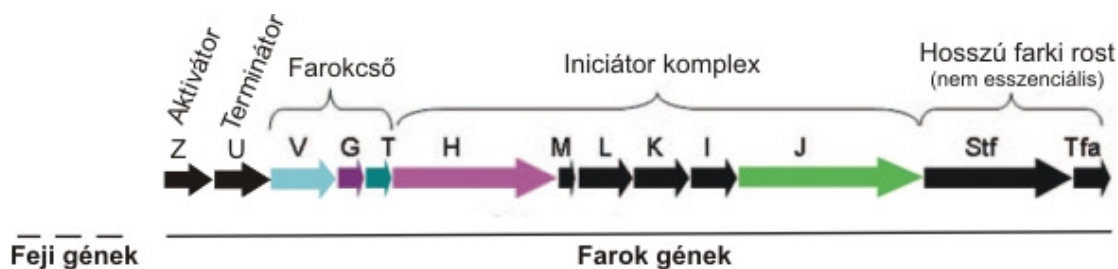
#### 5. ábra: A $\lambda$ fág elektronmikroszkópos képe

**a:** eredeti izolátum, mely egy központi, valamint hosszú, vékony farki oldalrostokkal rendelkezik

**b:** laboratóriumi törzs, melynél az *stf* génben lévő *frame-shift* mutáció következtében hiányoznak az oldalrostok (skála: 100 nm) (Hashemolhosseini *et al.*, 1996).

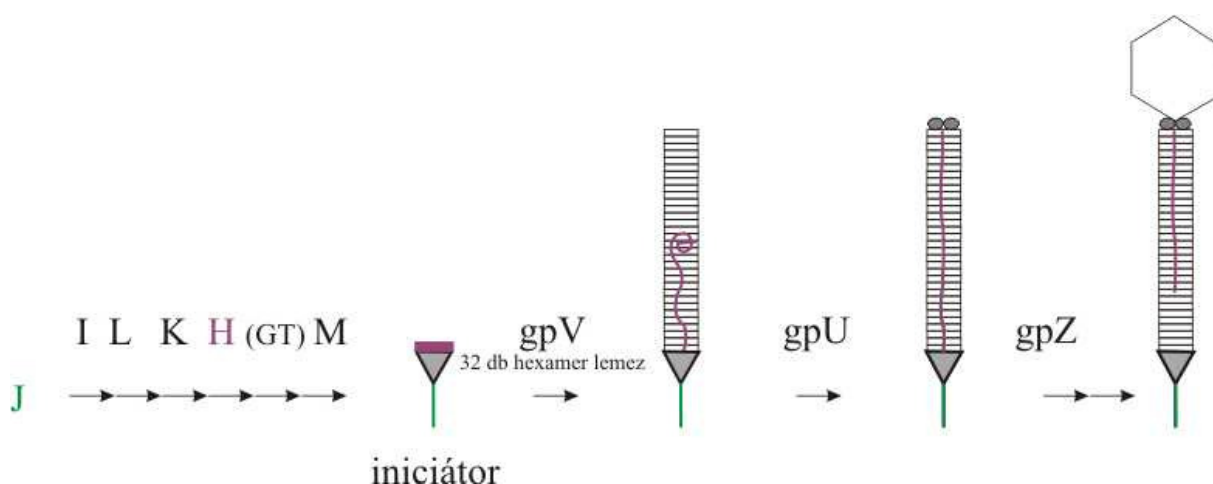
A farokalkotó fehérjemolekulák felépítéséért és ezek összeszerelődéséért tizenegy gén (Z, U, V, G, T, H, M, L, K, I, J) felelős (6. ábra). Rajtuk kívül az oldalrostok kialakításában az *stf* és *tfa* gének termékei vesznek részt (ezek a gének nem esszenciálisak, a laboratóriumi izolátumoknál egy *frame-shift* mutáció következtében az oldalrostok hiányoznak).





6. ábra: A  $\lambda$  fágfarok struktúrájának kialakításában részt vevő gének

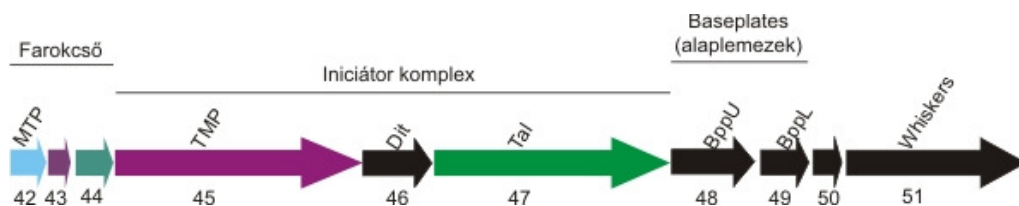
A farok a fejtől függetlenül épül fel, majd az elkészült farokstruktúra kapcsolódik a komplex, DNS-t már tartalmazó fejhez. A farok összeszerelődése a fejtől távolabb eső végén kezdődik, egy ún. iniciátor komplex összeállásával, melynek része a központi farki rostot felépítő gpJ fehérje, az I, L, K, G, T, M gének termékei, valamint a farok hosszát szabályozó gpH fehérje (a G és T géntermékek csak az összeszerelésben vesznek részt, a farok felépítésében nem) (7. ábra). A 853 aminosav hosszúságú (92 kDa) gpH fehérje erősen  $\alpha$ -helikális szerkezetű, mint egy fehérje-vonalzó funkcionál: méreténél fogva határozza meg a farokcső hosszúságát (135 nm). Maga a farokcső 32 darab egymásra épülő gyűrűszerű képletből áll, melyek a gpV (fő farok fehérje) hexamerei. A gpV-hexamerek addig rakódnak egymásra, míg eléri a farok hosszát szabályozó, „kinyúló” gpH fehérje fej-proximális N-terminális végét. A farok fejhez kapcsolódó részét a gpU és gpZ fehérjék zárják le. A gpU fehérje kapcsolódása után a gpH a C-terminális közelében lévő glicin-gazdag régiónál hasad, így az érett fágreszecskeben már a 80 kDa nagyságú gpH\* proteolitikus forma van jelen, melynek fontos szerepe van a fertőzés során a DNS gazdasejtbe injektálásában. (Katsura and Hendrix, 1984) (Katsura, 1987) (Katsura, 1990).



7. ábra: A  $\lambda$  fágfarok összeszerelődésének sematikus rajza (részletes leírás a szövegben).

## 2.2.2. További fágfarok összeszerelődési mechanizmusok: hasonlóságok és eltérések a $\lambda$ fágtól

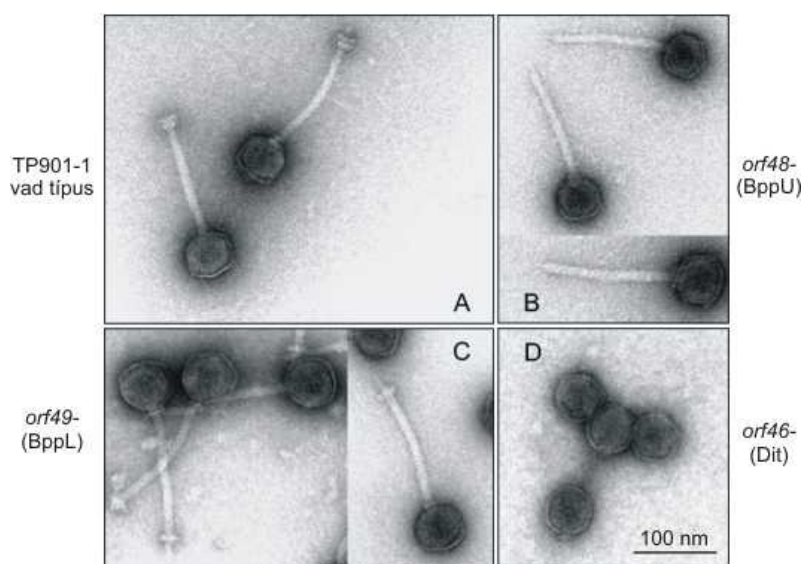
Az utóbbi években részletesen tanulmányozták a *Siphoviridae* TP901-1 lactococcus fágfarok összeépülését (Vegge *et al.*, 2005) (Mc Grath *et al.*, 2006). A TP901-1 farok szerkezete annyiban tér el a  $\lambda$ -tól, hogy a központi farki rost körül 2 lemezszerű struktúra (alsó és felső *baseplate*) helyezkedik el (9/A. ábra). A farok felépítésében részt vevő gének elrendeződése is erős hasonlóságot mutat a  $\lambda$  farok régiójával (8. ábra).



### 8. ábra: A TP901-1 lactococcus fágfarok struktúrájának kialakításában részt vevő gének

MTP – fő farokfehérje (*major tail protein*), TMP – farokhosszat meghatározó fehérje (*tail tape measure protein*), Dlt – disztális farokprotein, Tal – peptidoglükán lítikus aktivitással rendelkező farki rost fehérje (*tail associated lysin*), BppU és BppL – felső és alsó alaplemezt felépítő fehérjék, valamint a nyak körüli „bajuszt” (*whiskers*) kialakító fehérje génjei.

A farok felépülés mechanizmusának tanulmányozásához az egyes géneket kiütötték, és elektronmikroszkóppal vizsgálták a mutánsok fenotípusát (9. ábra).

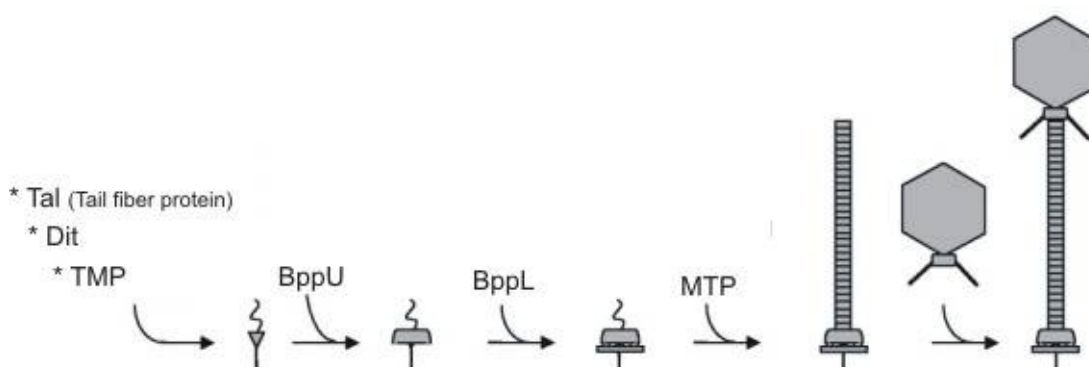


### 9. ábra: A TP901-1 vad típusú és három nullmutáns fág elektronmikroszkópos képe

**A:** vad típus egy központi farki rosttal, körülötte egy felső és egy alsó lemezszerű képlettel (*baseplate*), **B:** a BppU fehérje hiányában *baseplate* nélküli farok képződik, **C:** a BppL fehérje hiányában csak felső *baseplate*-t tartalmazó farok képződik, **D:** az iniciátor komplex részét alkotó Dlt fehérje hiányában nem épül össze a farok. (Vegge *et al.*, 2005)

A  $\lambda$ -hoz hasonlóan itt is szükséges az iniciátor kialakulása a farokcső polimerizációjához (10. ábra). Ennek tagjai a TMP, Dit és Tal fehérjék, melyek bármelyikének hiányában nem épül össze a farok (9/D. ábra). A két alaplemez a farok felépülésében nem esszenciális, ugyanis a BppU és BppL fehérjék hiányában összeépül a *baseplate* nélküli, vagy csak a felső lemezt tartalmazó farokstruktúra (9/B, C. ábra). A Vegge és munkatársai által felállított modell szerint a felső és alsó alaplemezek függetlenül szintetizálódnak, és utólag kapcsolódnak a disztális farokvéghez, előbb a felső alaplemez, majd ehhez az alsó alaplemez (10. ábra) (Vegge *et al.*, 2005) (Mc Grath *et al.*, 2006).

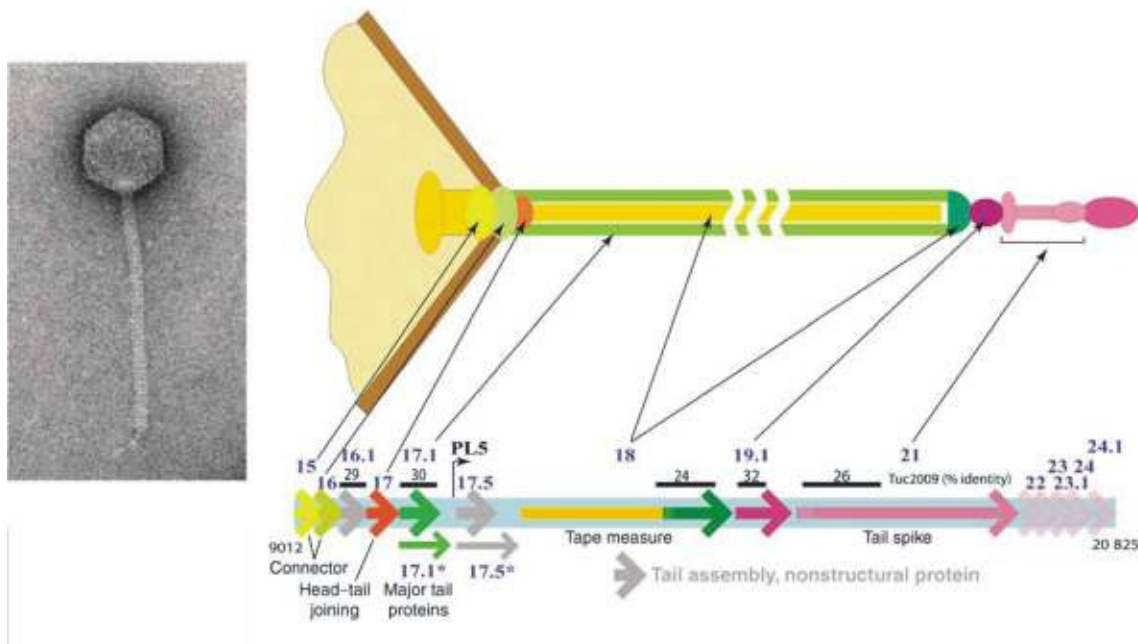
Párhuzamba állítva ezt a  $\lambda$  modellel úgy tűnik, hogy a központi farki rost ( $\lambda$  – J, TP901-1 – Tal) génjétől *downstream* elhelyezkedő gének az összeépülés tekintetében nem esszenciális struktúrfehérjéket kódolnak (oldal farkirostok, alaplemez-struktúrák, nyaki „bajusz”). Funkcióját tekintve a TP901-1 alaplemeze elengedhetetlen a fágreceptor felismeréséért (ld. 2.3. fejezet), a  $\lambda$  fág oldal farki rostjainak eredeti funkciója nem ismert.



#### 10. ábra: A TP901-1 fágfarok összeszerelődés modellje

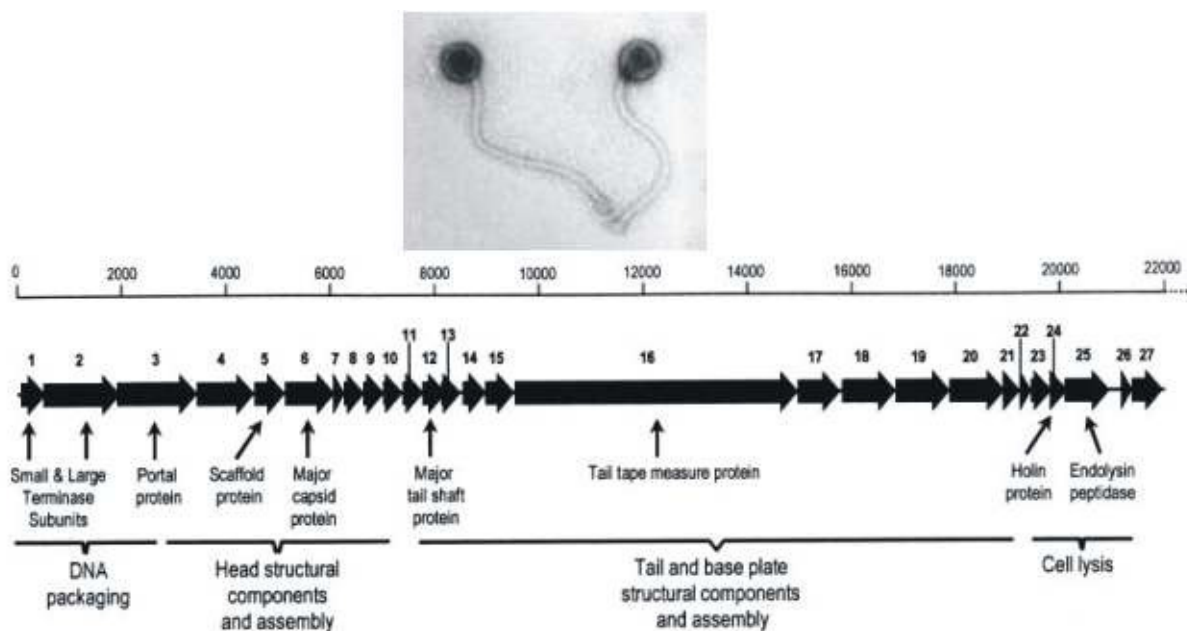
Az iniciátor komplex kialakításában részt vesznek a Tal, Dit, TMP fehérjék, melyen elindul a farokcső polimerizációja (MTP – fő farki fehérje). A felső és alsó alaplemezek függetlenül szintetizálódnak, és utólag kapcsolódnak a disztális farokvéghez, előbb a felső alaplemez, majd ehhez az alsó alaplemez (Vegge *et al.*, 2005).

Az általános szabályszerűségek alátámasztásaképpen, az ugyancsak *Siphoviridae* SPP1 bacillus fágfarok génrégióját és a gének által kódolt fehérjék funkcióját mutatja be a 11. ábra. A farki rost (*tail spike*) géntől *downstream* már nem találhatóak ún. nem esszenciális gének, ahogyan ez a fág elektronmikroszkópos képe alapján – a fentiek fényében – nem is várható.



11. ábra: Az SPP1 bacillus fág elektronmikroszkópos képe, a farki génrégió szerkezete és az egyes fehérjék funkciója (Plisson *et al.*, 2007).

A fark hosszának meghatározására kiugró példa a *Siphoviridae* A118 listeria fág, melynél az extrém hosszú (300 nm) fark hossza az ugyancsak szokatlanul nagy méretű TMP fehérje (1795 aminosav, a gén: 5385 bp) által szabályozott (12. ábra) (Loessner *et al.*, 2000).



12. ábra: Az A118 listeria fág és genomjának egy része (kései régió) (Loessner *et al.*, 2000).

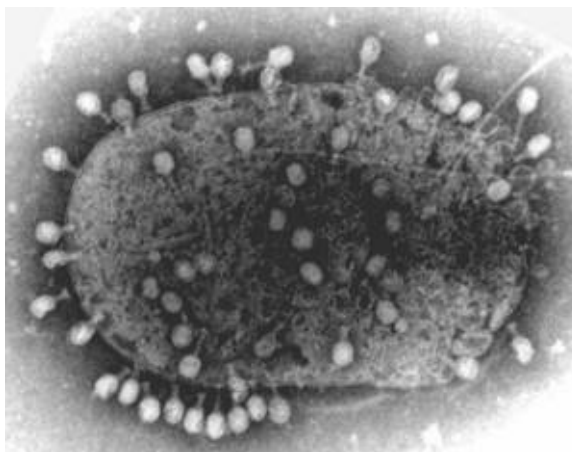
### 2.3. A farokkal rendelkező fágok kapcsolódása a baktérium fágreceptorával

A farokkal rendelkező fágok (*Caudovirales*) infekciós folyamata a gazdabaktérium felszínén található valamilyen struktúra (receptor) felismerésével illetve kötésével kezdődik. A folyamatban részt vevő fehérjék (antireceptorok) általában a fágfarok disztális részében helyezkednek el. Az antireceptor azonosításának lehetséges módjai: kötődésben hibás, vagy megváltozott gazdaspecifitást eredményező (ún. *host range*) spontán mutációk izolálása, továbbá olyan kiméra fágok létrehozása, melyekben a feltételezett antireceptor génjét egy közel rokon, de más receptorspecifitással rendelkező fág antireceptor génjével cserélik ki (Montag *et al.*, 1989). Csakis a receptorkötő domént kicserélve megváltozott specifitású kiméra antireceptor fehérjéket is létrehoztak már (Siponen *et al.*, 2009). Az antireceptor génjének felismerésében támpontot nyújthat az az általános felismerés, hogy közel rokon, de eltérő receptorspecifitású fágoknál az antireceptor, más struktúrfehérjékkel ellentétben, nagyfokú variabilitást mutat. A legtöbb *E. coli* fágnál, pl.  $\lambda$ , P2, T4 a receptorfelismerő fehérje a farki rostban helyezkedik el (Wang *et al.*, 2000) (Haggard-Ljungquist *et al.*, 1992) (Lu and Henning, 1994). Másutt (T5, BF23 fágok) kimutatták, hogy a hosszú farki rost feletti kúpos farokvég vesz részt a receptor felismerésében (Heller and Schwarz, 1985). A TP901-1 lactococcus fág esetében a disztális farokstruktúra két alaplemezből és egy túlnyúló farki rostból áll. A receptorfelismerésért az alsó lemez felelős, a túlnyúló farki rost a vastag Gram-pozitív sejtfa enzimikus bontását végzi, felfedve ezzel a plazmamembránban helyet foglaló receptorfehérjét (Vegge *et al.*, 2006).

## 2.4. Bakteriofág receptorok típusai

A különféle bakteriális sejtfelszíni komponensek fontos szerepet töltenek be a biológiai felismerési folyamatokban, nemcsak a szimbiotikus kapcsolatok kialakulásában, hanem a baktérium–bakteriofág felismerésekben, valamint a prokarióta–eukarióta patogén mechanizmusokban is. Közös molekuláris elemek fedezhetők fel például a rhizobiumok–pillangósvirágúak szimbiózisában, valamint számos *Brucella* és *Bartonella* baktériumfaj patogenezisében (LeVier *et al.*, 2000).

Mint minden vírus, a bakteriofágok is a fertőzött sejt biokémiai rendszerét „kényszerítik rá” saját maguk megsokszorozására. A fágok szaporodása a gazdasejthez való specifikus kötődéssel kezdődik (13. ábra). A megtapadásra, illetve a genom beinjektálására a fágok számos stratégiát alkalmaznak. A fágreceptorok a legkülönbélebb sejtfelszíni komponensekből tevődhetnek össze, melyekkel a fág által kódolt receptorkötő (antireceptor) fehérje lép interakcióba. Az alábbiakban a leginkább tanulmányozott bakteriofág receptor típusokat foglalom össze, különös tekintettel a Gram-negatív baktériumcsoportra.



**13. ábra: *E. coli* baktérium felszínéhez tapadt T4 fágok**

(Forrás: Prof M. V. Parthasarathy, Cornell Integrated Microscopy Center, Cornell University)

### 2.4.1. Fehérje természetű fágreceptorok

Az egyik legjelentősebb prokarióta modellorganizmus az *E. coli*, melynek ma már több tucat bakteriofágja ismert. Döntő többségük külső membránproteint, illetve a külső és belső membránt átérő polipeptid transzportapparátust használ ki a gazdasejt megfertőzéséhez. Sok esetben ezek egyéb sejtfunkciókat ellátó transzportrendszerek, a legtöbbször valamilyen specifikus szubsztrát felvételéért felelősek.

Az egyik legrészletesebben tanulmányozott baktérium–bakteriofág rendszer az *E. coli* K12 törzs és  $\lambda$  fágja. A fág receptora a maltóz és maltodextrinek transzportjáért felelős csatornaformáló trimer külső membránfehérje, a **MalB**, régebbi elnevezés szerint LamB (Randall-Hazelbauer and Schwartz, 1973). Ezzel közvetlen kölcsönhatásban a  $\lambda$  fág farkirost J fehérjéje áll. A *malB* génben történő, fágrezisztenciát eredményező missense pontmutációkra a rajtuk izolálható *host range* fágmutánsok szintén egy-egy missense mutációval „reagálnak”, melyek mind a *j* génnek a farkirost C terminálisát kódoló részére esnek, azaz a receptorkötésért ez a fehérjerész felelős. A MalB fehérjén kívül további két, mannóztanszportban részt vevő, citoplazmatikus integráns membránprotein (II-C<sup>Man</sup>, II-D<sup>Man</sup>) szükséges a  $\lambda$ -DNS penetrációjához (Werts *et al.*, 1994) (Charbit *et al.*, 1994) (Wang *et al.*, 1998) (Wang *et al.*, 2000).

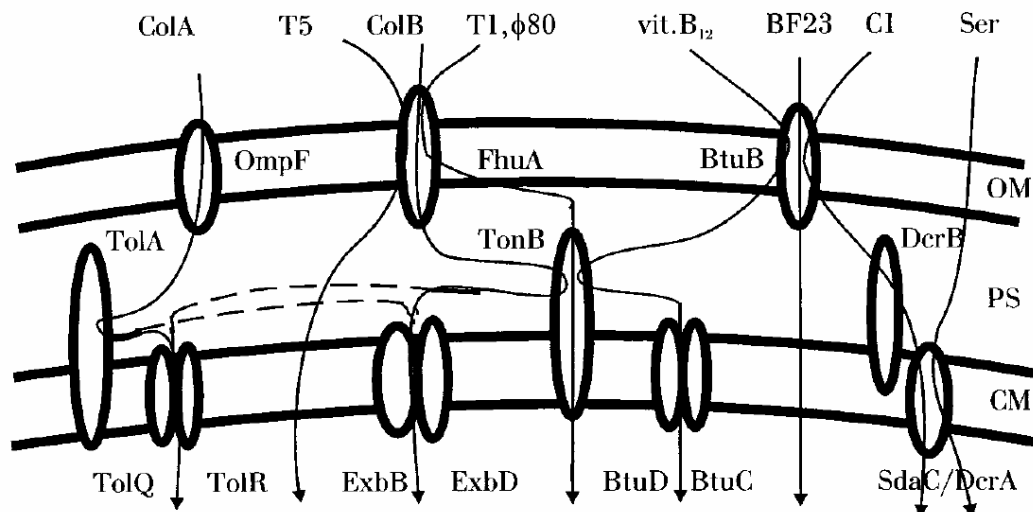
Az *E. coli* külső membránjába ágyazott **Tsx** nukleozid-specifikus csatornafehérje receptorként szolgál néhány bakteriofág (T6, Ox1, H3), valamint a kolicinK bakteriocin számára (Bremer *et al.*, 1990). A receptorfunkció kialakításáért a fehérje mintegy 25 aminosavnyi szegmense felel, ugyanis a többszörösen fágrezisztens sejtek esetében a mutációk (missense mutációk, deléciók, duplikációk) mind az ennek megfelelő DNS-szakaszra estek (Schneider *et al.*, 1993).

Az **OmpA** szintén a külső membránban elhelyezkedő fehérje, mely nyolc transzmembrán doménjével úgy ágyazódik a membránba, hogy négy nagy extracelluláris hurkot képez. Az *E. coli* számos bakteriofágjának (K3, K4, K5, AC3, Ox2, Ox3, Ox4, Ox5, M1 stb.) a receptora, és az egyes fágok a fehérje különböző részeit ismerik fel specifikusan (Morona *et al.*, 1985). Az OmpA fehérje fő feladata az F-konjugáció stabilizálása a recípiens sejt által (Koebnik, 1999).

Az, hogy periplazmatikus, valamint belső membránprotein szerepet játszon egy fág adszorpciójában, nem túl gyakori, de előfordul. Ilyen **multigén-adszorpcióra** példa az *E. coli* N4 fágja, mely genomjának baktériumsejtbe juttatásához igényel egy külső (**NfrA**) és egy belső (**NfrB**) membránproteint, valamint két további fehérjét, melyek közül az egyik még nem eléggé karakterizált (**NfrD**), a másik pedig (**NfrC**) a citoplazmában helyezkedik el (Kiino *et al.*, 1993a) (Kiino *et al.*, 1993b).

A **FhuA** egy multifunkcionális külső membránreceptor, mely eddigi ismereteink szerint a ferrikróm, kolicinB és -M, albomicin, mikrocin 25 felvételben játszik szerepet, továbbá elengedhetetlen a T5 bakteriofág, valamint az ún. TonB-dependens fágok (T1,  $\Phi$ 80) adszorpciójához (14. ábra) (Hancock and Braun, 1976). A T5 fáginfekció kivételével

valamennyi felsorolt transzport energiaigényes folyamat, és mindegyik a TonB–ExbB–ExbD rendszert igényli, ahol a citoplazmamembrán elektrokémiai potenciálja átalakul konformációs energiává, melyet a TonB periplazmatikus fehérje közvetít a FhuA receptor felé (Braun, 1995). A T5 fág a gazdasejt energiaszolgáltatása nélkül képes nyitni a csatornát (Bonhivers *et al.*, 1996).



**14. ábra:** Az *E.coli* többféle fágfertőzésben fontos néhány külső/belső membránfehérjeje és azok kapcsolatrendszer (részletes leírás a szövegben; forrás: Likhacheva *et al.*, 1996).

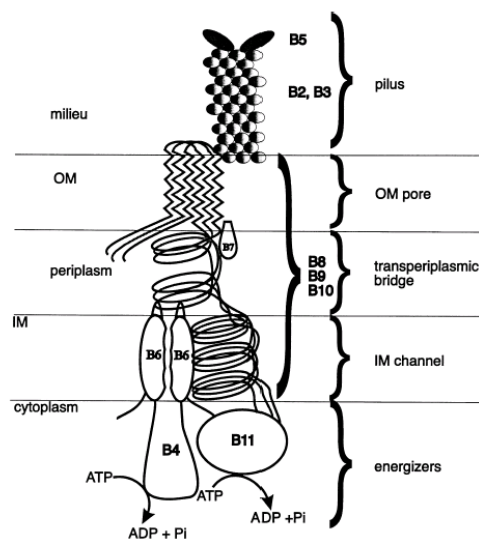
Hasonló eredmények születtek az *E. coli* K12 törzsére specifikus C1 fág receptorának elemzése során is. A sikeres infekcióhoz itt a külső membránreceptoron (**BtuB**) kívül még további két fehérje szükséges (14. ábra). Az egyik egy periplazmatikus fehérje, a DcrB – melynek funkciója feltehetően megegyezik a TonB fehérjével –, a másik pedig a DcrA belső membránfehérje (Likhacheva *et al.*, 1996). A DcrA fehérje régebbi elnevezése SdaC, és legelsőként megismert funkcióját tekintve egy erősen specifikus szerin transzporter (Shao *et al.*, 1994). Vannak olyan eredmények, melyek szerint a BtuB receptor nemcsak a DcrB energiatranszformáló fehérjével léphet interakcióba, hanem a TonB-vel is (Cadieux *et al.*, 2000). Így kerül felvételre például a B12 vitamin, további két belső membránfehérje (BtuD, BtuC) közreműködésével. Mindezekon kívül a BtuB receptorként szolgál a BF23 fág számára is, melynek infekciója viszont nem függ sem a DcrB, sem a TonB fehérjétől (Bradbeer *et al.*, 1976).

Mint láttuk, a membránfehérje természetű fágreceptorok elsősorban az *E. coli* fágjaira (az ún. colifágokra) jellemzőek, minek oka lehet egyrészt, hogy ez az egyik legintenzívebben tanulmányozott rendszer, másrészt pedig, hogy a gazdabaktérium egy Gram-negatív faj,



melynek sejtfal-felépítése lehetővé teszi ezt a felismerési formát (a külső membránfehérjék viszonylag könnyen hozzáférhetőek). Kivételes példa a Gram-pozitív *Bacillus subtilis* baktériumon szaporodó SPP1 fág (*Siphoviridae*), melynek receptora a YueB membránfehérje. Ennek extracelluláris régiója (ektodomain) átéri a vastag Gram-pozitív sejtfalat, így a receptor régió „láthatóvá” válik a fág számára (Sao-Jose *et al.*, 2004) (Plisson *et al.*, 2007).

A fehérje természetű fágreceptoroknak különleges formái a Gram-negatív baktériumokra jellemző ún. IVSP (*type IV pathway system*), multikomponensű, a teljes felszínt átérő transzportrendszer, mely proteinek és nukleoprotein komplexek transzlokációját biztosítja a donor sejtől ( $F^+$ ) a recipiens sejtbe ( $F^-$ ) a bakteriális konjugáció során. A transzportrendszerhez kapcsolódik a sejt felszínén található F-pílus, mely a konjugációban részt vevő baktériumsejtek kapcsolódását segíti elő. A komplex modelljét a 15. ábra mutatja be (Koebnik, 2001).



**15. ábra: A IVSP komplex sematikus ábrázolása** (Koebnik, 2001)

A modell több baktériumfajon végzett kísérleti munkán, valamint filogenetikai elemzéseken alapszik.

Több baktériumfaj esetében fedeztek már fel píluson, illetve a hozzá kapcsolódó transzportapparátuson keresztül fertőző, ún. donor-specifikus bakteriofágokat (filamentózus fágok), ilyen például az *E. coli* PRD1 fágja. Az *E. coli* más bakteriofágjai (pl. f1 és fd fágok) kapcsán leírták, hogy az adszorpcióhoz, az F-píluson kívül egy ún. koreceptorra, a TolQRA komplexre van szükség (Click and Webster, 1997).

Az előzőekkel nagy hasonlóságot mutat a koleratoxint kódoló CTXΦ és a *Vibrio cholerae* gazdasejt közötti interakció, ahol az ún. TCP (*toxin coregulated type IV pilus*),

valamint az *E. coli* TolQRA génjeivel erősen homológ gének nélkülözhetetlenek a fágfertőzéshez. Mindez bizonyítja, hogy a pílus-specifikus bakteriofágok gazdasejt penetrációjának mechanizmusa konzerválódott a különböző baktériumfajok esetében (Heilpern and Waldor, 2000).

#### 2.4.2. Többféle molekulatípusból álló fágreceptorok

Bizonyos esetekben a fáginfekciót nem csupán egy sejtfelszíni struktúra kontrollálja, hanem a target sejt felszínének több sajátja együttesen fontos.

Az AR1 (*Myoviridae*) bakteriofág kizárólag az *E. coli* O157:H7 szerotípusba sorolható izolátumait képes fertőzni. A specifikusban fontos szerepe van az OmpC receptorfehérjének, mely elsődleges szerkezetében különbözik az *E. coli* K12 törzstől. A fehérjék a 176-226 aminosavak között mutatják a legtöbb eltérést (Yu *et al.*, 1998). Spontán fágrezisztens mutánsok elemzése is alátámasztotta, hogy az AR1 fág gazdaspecifikusát ez a fehérjerész befolyásolja. Azt is kimutatták, hogy ép lipopoliszacharid (LPS) hiányában az OmpC gyengébben köti a fágot. Ugyanilyen gyenge kötődés tapasztalható, amikor az eredeti receptort a K12 törzsből származó OmpC-vel helyettesítik. Az AR1 fág maximális kötődéséhez tehát az **OmpC fehérje és az LPS együttesen** szükséges. Az LPS funkciója ebben még nem tisztázott. Elképzelhető, hogy direkt kötődéssel könnyíti a fágadszorpciót, vagy indirekt járul hozzá, a külső membrán fehérjeösszetételének befolyásolása által (Yu *et al.*, 2000).

Ugyancsak az *E. coli* O157:H7 patogén törzsre specifikus a PP01 bakteriofág, melynek gazdasejthez kötődéséért az ép LPS felelős elsődlegesen, és minden alternatív szerkezetű LPS mintegy barrierként szolgál, megakadályozva, hogy a fág hozzáférjen az OmpC fehérjéhez (Morita *et al.*, 2002).

Az Rtp nevű colifág esetében különös, ritka szerkezetű disztális farokstruktúrát írtak le: a farki rostok robusztus, levélrőzsára emlékeztető bunkós megvastagodásban végződnek (ld. 2.1 fejezet elektronmikroszkópos felvétel) (Wietzorrek *et al.*, 2006). Receptorának azonosítása céljából különféle LPS és külső membránfehérje *E. coli* mutáns baktériumtörzseken végeztek vizsgálatokat. Az LPS bizonyítottan elősegíti az Rtp fág megtapadását a baktérium felszínén, de az infekcióhoz szükség van eddig még azonosítatlan, fehérje természetű struktúrára is (Wietzorrek *et al.*, 2006).

### 2.4.3. Poliszacharid jellegű fágreceptorok

A különféle poliszacharidok a baktériumsejtek felszínének fontos antigénjei, és amint láttuk a fentiekben, gyakran bakteriofágok megtapadását is biztosítják/elősegítik (részletesebb bemutatásuk a 2.6. fejezetben).

Az egyik legkorábban megismert bakteriofág az állati patogén *Streptococcus* (C-csoport) törzsek C<sub>1</sub> fágja (*Podoviridae* lsd. 2.1. fejezet), melynek a teljes genom DNS-szekvenciája ismert (Nelson *et al.*, 2003). Nem fogékonyak viszont a C<sub>1</sub> fágfertőzésre a humán patogén *Streptococcus* (A-csoport) törzsek, valamint az ún. A-variáns *Streptococcus* csoport képviselői sem. Továbbá a pronáz, tripszin és chymotripszin kezelt C-streptococcusok érzékenyek maradnak a C<sub>1</sub> fáginfekcióra, ami arra utal, hogy a fág nem protein természetű receptorhoz kötődik (Nelson *et al.*, 2003). Feltehetően az említett három *Streptococcus* csoport sejtfelszíni szénhidrátjainak szerkezetében fellelhető különbözőségek okozzák a fággal szemben mutatott eltérő fenotípust. A közös poliramnóz gerinchez a C-csoportban két N-acetil-galaktózamin (GalNAc), az A-csoportban pedig egy N-acetil-glükózamin (GlcNAc) oldallánc kapcsolódik, míg az A-variáns streptococcusoknál teljesen hiányoznak az oldalláncok. Ezek alapján a GalNAc, monomer vagy dimer formában, fontos eleme a fágreceptornak (Nelson *et al.*, 2003). Egy másik streptococcus fág (M102) esetében pedig bizonyos szerotípusok specifikus felismeréséért ugyanezen poliszacharid glükóz oldalláncának van jelentősége (Shibata *et al.*, 2009).

A ΦYeO3-12 fág a humánpatogén *Yersinia enterocolitica* O:3 szerotípusra specifikus. A fág receptora a felszíni **lipopoliszacharid O-oldallánca (O-antigén)**, mely egy 6-deoxy-L-altropyranóz egységekből álló homopolimer. Mindezt igazolja, hogy a *Y. enterocolitica* O:3 szerotípus *E. coliban* klónozott O-antigénje fággal szembeni érzékenységet okoz, továbbá a spontán fágrezisztens *Y. enterocolitica* O:3 mutánsok mindegyikében hiányzott az O-antigén (Skurnik *et al.*, 1995).

A fágfertőzés különleges formája, amikor a fág farkirost fehérjéje mind az adszorpcióban, mind a gazdasejt penetrációjában fontos szerepet játszik, ugyanis a **kapszuláris poliszacharidhoz (K-antigén)** történő specifikus tapadás után a farkirost – poliszacharid depolimerizációs aktivitása által – enzimatikusan oligoszacharidjaira degradálja a K-antigént. Erre a különféle K-antigénnel rendelkező *E. coli* törzsek és az ún. kapszula-specifikus fágjaik szolgálnak példának. A K5A bakteriofág gazdája kizárólag a K5 antigént [-4) βGlcA-(1,4)-αGlcNAc-(1-] termelő *E. coli* törzs, ahol a fág KfIA (*capsular polysaccharide lyase*) enzimje által, β-eliminációval hasítja a poliszacharidot (Hanfling *et al.*,

1996). Ezzel ellentétben a K1E fág farkirostja N-acetil-neuraminidáz (endozialidáz) enzimet tartalmaz, mely csakis a K1 típusú kapszula  $\alpha$ -2,8 kötéssel kapcsolt, poli-N-acetil-neuraminsav polimer hasadását katalizálja, következésképp csak a K1 poliszacharidot termelő *E. coli* törzsön képes szaporodni (Tomlinson and Taylor, 1985). Egyedülálló a K1-5 fág gazdaspecifitása, ugyanis mind a K1, mind a K5 poliszachariddal rendelkező *E. coli* törzseket képes fertőzni. Ennek oka, hogy a fágnek mindkét előbbi farkirost fehérjéje megvan. Ezek két átfedő ORF-ben kódoltak, melyek közül az első a K5-liáz, a második pedig az endozialidáz enzimfehérje génje. A két gén erős homológiát mutat a K5 és K1E fágok farkirostot kialakító génjeivel (Scholl *et al.*, 2001). Számos egyéb K-antigént termelő (K3, K7, K12, K13, K20) *E. coli* törzsre specifikus bakteriofágot leírtak, melyek feltehetően szintén valamilyen poliszacharid-depolimerizációs aktivitással rendelkeznek (Nimmich *et al.*, 1992).

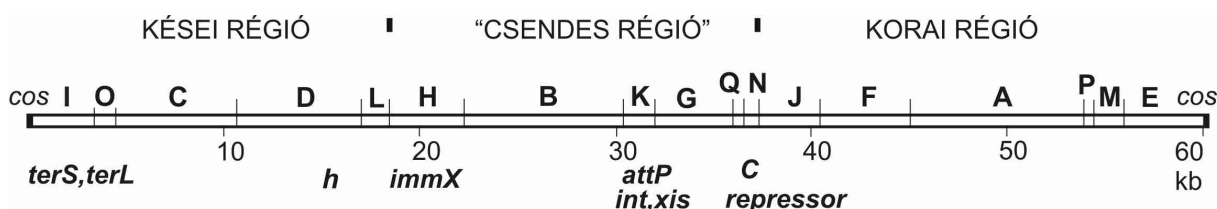
Hasonló mechanizmus alapján fertőzi az A7 bakteriofág a *Pseudomonas aeruginosa* AK1401 sejtjeit. Receptorként itt a felszíni lipopoliszacharid D-ramnóz összetételű cukor-oldallánca szolgál, melyet a fág – a termelt ramnanáz enzimje által – hidrolizálni képes, felfedve ezáltal az infekciót elősegítő core-lipidet (Rivera *et al.*, 1992).

Ezekben az esetekben eddig még nem találtak olyan fehérje természetű komponenst, melynek szerepe lehet a fágadszorpcióban. Feltételezhető azonban, hogy a fággenom sejtbe juttatásához szükség van pórus fehérjé(k)re is.

## 2.5. A 16-3 fág mint a legrészletesebben tanulmányozott rhizobium fág

A 16-3 bakteriofág a *Sinorhizobium meliloti* 41 törzs temperált fágja, melyet Szende és Ördögh izolált Balatonberény környékén (Szende and Ördögh, 1960). Vizsgálata az 1960-as évek elejétől intenzíven folyik. A fág adszorpciója a gazdasejthez rendkívül gyors és hatékony folyamat, életciklusa 28 °C-on 100 perc (Orosz and Sik, 1970). A fágot felépítő strukturális fehérjéket különféle elválasztástechnikákkal vizsgálták, és a fej-farok disszociációs módszerek segítségével 2 farki és 6 feji fehérjét azonosítottak (Erdei *et al.*, 1982).

A 16-3 fág több molekuláris biológiai sajátosságában is emlékeztet a  $\lambda$  fágra, és ahhoz hasonlóan egy speciális transzdukáló fág. Kromoszómája kétszálú, lineáris, 60,8 kbp nagyságú DNS-molekula (Dallmann *et al.*, 1979). Tizenhárom féle restrikciós endonukleáz segítségével elkészítették a fág kromoszómájának több, mint száz hasítóhelyet tartalmazó fizikai térképét (Dorgai *et al.*, 1981). A fág kezdeti genetikai analízisét mintegy 150 izolált hőmérséklet-érzékeny mutáns tette lehetővé (Orosz and Sik, 1970) (Orosz *et al.*, 1973) (Orosz *et al.*, 1980). A mutánsokat 42 komplementációs csoportba, a géneket pedig megnyilvánulásuk ideje szerint korai és kései típusba sorolták (Orosz *et al.*, 1973). A kései gének csak akkor íródnak át, ha a korai gének megfelelően működnek (Orosz *et al.*, 1980). A fág *EcoRI* fizikai térképét és az ismert génrégiók elhelyezkedését szemlélteti a 16. ábra.



16. ábra: A 16-3 fág fizikai (*EcoRI*) és genetikai térképe

Több fontos lókuszt molekuláris biológiai elemzése megtörtént. Ilyen például a fő represszor fehérjét kódoló *c* regulátor gén, mely a fág lizogén fejlődését szabályozza (Dallmann *et al.*, 1987) (Orosz and Sik, 1970) (Orosz *et al.*, 1980) (Dorgai *et al.*, 1983). Hőérzékeny mutációi 28 °C-on vad típusú (zavaros), 36 °C-on tiszta tarfoltú fenotípust mutatnak. A *C* represszor fehérje az *O<sub>L</sub>* és *O<sub>R</sub>* operátorokon keresztül vesz részt a transzkripció szabályozásában. Az operátorhoz való kötődésért a 263 aminosav hosszúságú fehérje N-terminális hélix-turn-hélix DNS-kötő motívuma felel (Papp *et al.*, 2002). A *C* represszor DNS felismerő specifikációja nagy hasonlóságot mutat a 434 elnevezésű lambdoid

fágéhoz, képes felismerni a 434 fág operátorát, valamint a 434 fág represszora is képes felismerni a 16-3 O<sub>R</sub> operátort (Dallmann *et al.*, 1991).

Azonosították a fág és a baktérium kromoszómáján lévő *att* (*attachment* B – baktérium, P - fág) régiókat, és tanulmányozták a fág integrációjának mechanizmusát. A fág integrációja a *S. meliloti* kromoszóma meghatározott helyén, a *cys46* és a *met5* gén között, az *attB* régiónál történik. Ebből adódik, hogy a fág képes speciálisan transzdukálni a *cys46* gént (Kiss *et al.*, 1980). Az integrációt a fág *int* génje által kódolt, a tirozin rekombináázok családjába tartozó 16-3 integráz enzim (16-3 Int) katalizálja (Semsey *et al.*, 1999). A 16-3 profág kivágódása során szerepet játszó 16-3 Xis fehérje génjét (*xis*) azonosították, és az *int* gén 3' végének közelében lokalizálták az *attP* helyet (Semsey *et al.*, 1999). Az *attB* hely szekvenciájának megismerése felfedte, hogy az egy aktív *prolin tRNS(CG G)* gén 3' végével van átfedésben (Papp *et al.*, 1993). A fág integrációja során keletkező att<sub>L</sub> (bal oldali) hibrid régióban helyreáll a *prolin tRNS(CG G)* gén szerkezete, és működése sértetlen marad. A fenti ismeretek felhasználásával egy vektorcsaládot is kifejlesztettek, mely a fág *int* génjét és *attP* régióját hordozza, és segítségével bármely gén célzottan beépíthető a *S. meliloti* 41 kromoszóma *attB* helyére (Semsey *et al.*, 2002) (Blaha *et al.*, 2004).

A lizogén *S. meliloti* felülfertőzéssel szembeni immunitását a 16-3 profág *immC*, *immX* és *avirT* régióinak kölcsönhatása alakítja ki. Az *immX* régió szerkezeti felépítését nagyfokú egyediség jellemzi: az X<sub>U/L</sub> rész két nagymértékben átfedő cisztron által kódolja a pX<sub>U</sub> és pX<sub>L</sub> fehérjéket, az X<sub>V</sub> rész pedig az X<sub>U/L</sub> represszió *cis*z célrégióját tartalmazza. A lizogén állapot felé vezető genetikai útvonalon az *immX* aktivitása megelőzi az *immC* működését (Csiszovszki *et al.*, 2003).

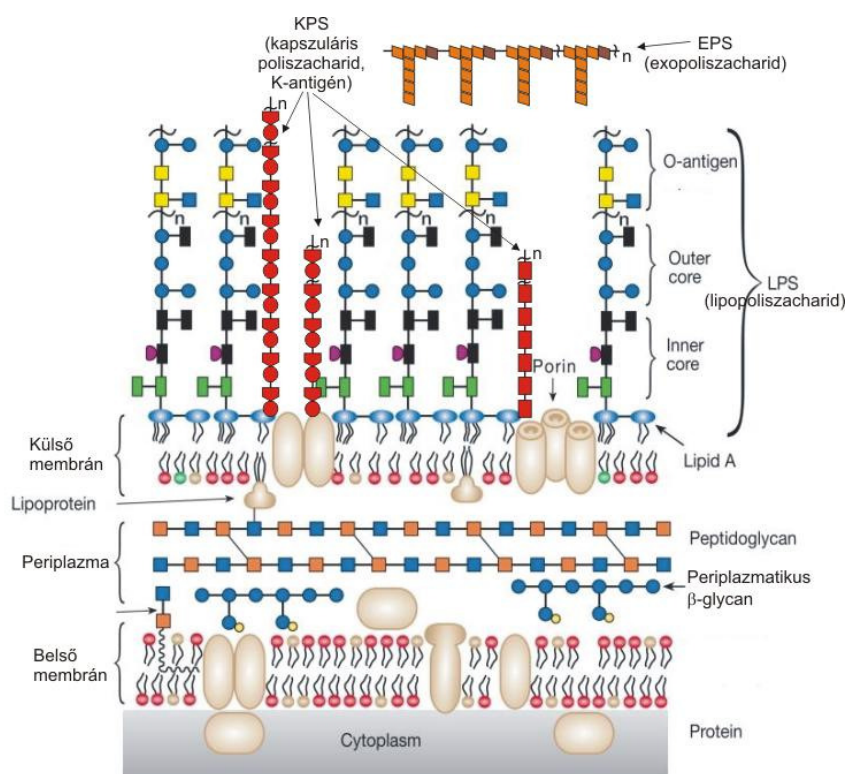
Azonosították a fág-DNS pakolásban szerepet játszó kulcsfontosságú elemeket: a 10 bp hosszúságú 3' túlnyúló ragadós végeket (a *cos* régióban), valamint a fág-DNS fejbe pakolását biztosító molekuláris motor központi elemét, a termináz enzim kis (TerS) és nagy (TerL) alegységének kódoló régióit (Ganyu *et al.*, 2005).

Egy *host range* mutáció izolálását és térképezését is elvégezték, s ennek segítségével a feltételezett farkirostot felépítő antireceptor gént az *EcoRI*(D) fragmentre lokalizálták, de a régió további vizsgálata nem történt meg (Orosz and Sik, 1970).

## 2.6. A *S. meliloti* sejtfelszíni poliszacharidjai

Munkánk részben a *16-3* fág receptorának azonosítására irányul. Az elmúlt évek kutatásai ráirányították a figyelmet arra, hogy a baktérium-növény és a baktérium-fág felismerésben közös molekuláris elemek játszhatnak szerepet a rhizobiumokban, ugyanis a növényi szimbiózis kezdő lépéseinek (specifikus felismerés) kialakításában hibás baktérium mutánsok egy részénél a baktérium-fág felismerés is sérült. Közismert, hogy a partnerspecifikus felismerésben a rhizobiumok sejtfelszíni poliszacharidjai töltenek be kulcsszerepet, ezért ezeket a molekulatípusokat az alábbiakban részletesebben bemutatom.

A *S. meliloti* – más Gram-negatív baktériumhoz hasonlóan – különféle mucoid sejtfelszíni poliszacharidokat termel, ezek az exopoliszacharidok, lipopoliszacharidok és kapszuláris poliszacharidok (17. ábra). Ezek a molekulák kulcsfontosságú szerepet töltenek be a baktérium-növény nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának több lépésében is, mint például a specifikus felismerésben, a növény inváziójában, az infekciós fonal növekedésében, a megváltozott környezethez való alkalmazkodásban (Kannenberg and Brewin, 1994) (Jones *et al.*, 2007).



### 17. ábra: Egy Gram-negatív baktériumsejt felszínének sémája

A sejt felszínén előforduló poliszacharidok a KPS, EPS, LPS (részletes tárgyalásuk a szövegben).  
(forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>, Essentials of Glycobiology, módosítva).

A *Rhizobium* fajok által termelt **exopoliszacharidok** (EPS) a sejt környezetébe szekretálódnak. Alapvető molekulaszervezetük alapján három típusukat különböztetik el. Az EPS-I 7-9 hexóz származékból álló ismétlődő alegységek heteropolimere. Az alegységeken szukcinil, acetil és piruvil módosításokat tartalmaz (Kannenberg and Brewin, 1994). A *S. meliloti* által termelt EPS-I szukcinoglükán néven ismert, hét glükóz és egy galaktóz molekulát tartalmazó, ismétlődő oktoszacharid alegységekből épül fel (Frayse *et al.*, 2003). Az EPS-I-nek alapvető szerepe van a nitrogénkötő gümő létrejöttében, az infekciós fonal kialakulásában (Leigh and Walker, 1994). A másik, az EPS-II néven ismert exopoliszacharid glükózt és galaktózt tartalmazó diszacharid egységekből felépülő galaktoglükán, mely kisebb hatékonysággal ugyan, de képes helyettesíteni az EPS-I funkcióját a szimbiózisban (Pellock *et al.*, 2000). Az EPS-I és EPS-II poliszacharidok mellett különválasztják a periplazmatikus térben található ciklikus  $\beta$ -glükánokat, melyeknek fő szerepe a baktériumsejtek hipoozmotikus adaptációjának biztosítása a szimbiózis során (Jones *et al.*, 2007).

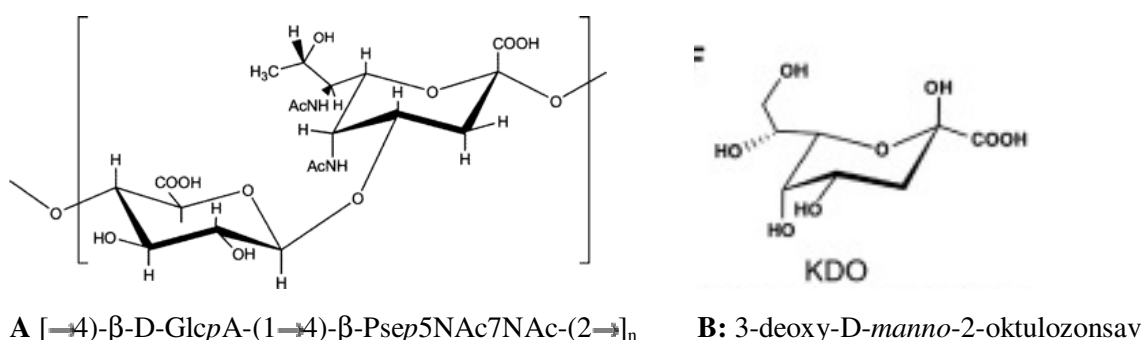
A **lipopoliszacharidok** (LPS) a Gram-negatív baktériumok sejtfelszínének azok a fontos alkotóelemei, melyek a legfőbb védekező mechanizmust biztosítják a külső környezeti tényezőkkel szemben. Rhizobiumokban az LPS szimbiózisban betöltött szerepe általában a partnerspecifikusság meghatározásában rejlik, de például a *S. meliloti* Rm41 törzsnél az LPS nem bizonyult fontosnak ebben a vonatkozásban (Lagares *et al.*, 1992). Szerkezetileg három egységre bonthatók. A külső foszfolipid membránba egy ún. horgonyzó molekulával, a lipidA egység segítségével rögzülnek, mely általában 4-6  $\alpha$ -hidroxizsírsavat hordozó, 2,3-diaminoglükózból áll. Ehhez kapcsolódik a Kdo (keto-deoksi-oktulozonsav) szerkezetű molekulán keresztül egy konzerválódott „core” oligoszacharid, melyhez a törzsspecifikus, immunogén aktivitással rendelkező O-antigén kötődik. Az O-antigén uronsavat, heptózokat tartalmazhat, de általában igen gazdag deoxi- és/vagy metildeoxi-cukor származékokban. A lipidA és a „core” oligoszacharid egységeket közösen tartalmazó LPS-t „rough” (R-LPS) formának nevezzük. Az O-antigén egységet is tartalmazó formát „smooth” LPS-nek (S-LPS) hívjuk. A baktériumot körülvevő környezet befolyásolhatja, hogy melyik forma jelenik meg a sejtfelszínen (Reuhs *et al.*, 2005).

A **kapszuláris poliszacharidok** szorosan kapcsolódnak a baktérium felszínéhez, tokot (*capsule*) képezve a sejt körül. Erős immunológiai sajátságuknak köszönhetően K-antigéneknek is nevezik őket. Széles körben elterjedtek a legkülönbözőbb humán- és növénypatogén baktériumfajok körében. Rhizobiumokban elsőként a *R. fredii* USDA205, és a



*S. meliloti* 41 törzsekben mutatták ki a kapszuláris poliszacharid jelenlétét, és a további elemzésekből kiderült, hogy adott rhizobium faj különböző törzsei eltérő szerkezetű molekulaváltozatokat termelnek (Forsberg and Reuhs, 1997). A K-antigének a szimbiotikus felismerésben, a gazdaspecifikusság meghatározásában fontosak (Reuhs *et al.*, 1993). A specifitásért a kapcsolódó oldalláncok eltérő mintázata, térszerkezetbeli, valamint molekulaméretbeli különbözőségei felelősek (Forsberg and Reuhs, 1997).

A K-antigének felépítésében gyakori elem a 3-deoxy-D-manno-2-oktulozonsav (Kdo) (18. ábra). A *S. meliloti* 41 törzs K<sub>R</sub>5 antigén néven ismert kapszuláris poliszacharidot termel, mely szerkezetében az *E. coli*, patogénitásban fontos, II-es típusú K-antigénjeivel analóg (Reuhs *et al.*, 1993). A K<sub>R</sub>5 antigén diszacharid alegységei egy glükuronsavból és egy 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradexoi nonulozonsavból (pseudaminsav, Pse) állnak, melyen 7-N-acetil és 5-N-β-hidroxibutiril módosítások találhatók (18. ábra) (Forsberg and Reuhs, 1997).



#### 18. ábra: Rhizobiális kapszuláris poliszacharidok jellemző alkotóelemei

**A:** A *Rhizobium sp.* NGR234 törzs K<sub>R</sub>5 antigénjének ismétlődő diszacharid alegysége: glükuronsav és módosított pseudaminsav. **B:** Kdo, azaz 3-deoxy-D-manno-2-oktulozonsav.

Az elmúlt években 3 olyan génrégiót azonosítottak, melyek a K<sub>R</sub>5 antigén bioszintéziséért felelősek (*rkp-1*, *rkp-2*, *rkp-3* régiók).

Az *rkp-1* régióban 10 gén található (*rkpA-J*), (Putnoky *et al.*, 1990) (Kiss *et al.*, 1997) (Petrovics *et al.*, 1993). A gének nagy része olyan fehérjéket kódol, melyek hasonlóak a különböző zsírsavszintézisben, valamint lipidmolekulák módosításában részt vevő génekkel (Reuhs *et al.*, 1993). Ez a génrégió a KPS szintézishez szükséges lipidhordozó előállítását kódolja. Ha bármelyik említett génben mutáció történik, akkor a KPS nem jelenik meg a baktérium felszínén. Az *rkp-1* régióban nincsenek olyan gének, melyeknek a cukoralegységek bioszintézisében vagy a KPS polimerizációjában lenne szerepe.

Az *rkp-2* régióban két gént azonosítottak. Az *lpsL* által kódolt fehérje egy UDP-glükuronsav epimeráz, mely a lipopoliszacharid bioszintézisében fontos. A másik, az *rkpK*

gén egy UDP-glükóz dehidrogenáz enzimet kódol, amely katalizálja az UDP-glükóz UDP-glükuronsavvá oxidálását. Ez utóbbi molekula alapvegyület az LPS és a KPS szerkezetében is (Kereszt *et al.*, 1998).

Az *rkp-3* régióban eddig 11 gént (*rkpL-Z*, és legutóbb az *rkpY*) azonosítottak (Kiss *et al.*, 2001) (Palvolgyi *et al.*, 2009) (ld. a 6.3. és a 6.4. fejezetekben a 20. és a 21. ábrák). Az *rkp-1* és *rkp-2* régió általánosan előfordul a *Sinorhizobium* genusban, ezzel szemben az *rkp-3* régió sokáig csak a *S. meliloti* 41 törzsben volt ismert, az utóbbi években írták le jelenlétét a *R. meliloti* NGR234 törzsben is. Az itt fellelhető gének feltehetően a K<sub>R5</sub> antigén pszeudaminsav bioszintéziséért, és a sejtfelszínre való exportálásáért felelősek. Vannak közöttük olyan gének, melyek homológiát mutatnak különféle transzferáz enzimet kódoló génekkel (például: *rkpM*, *rkpO*, *rkpP*), transzporter fehérjéket kódoló génekkel (például: *rkpS*, *rkpT*, *rkpR*). Az RkpZ fehérje a polimerizáció szabályozásában fontos, hiányában megnövekszik a K<sub>R5</sub> antigén lánc hosszúsága (Reuhs *et al.*, 1995). Legújabb eredmények szerint az RkpZ a Kdo homopolimer szintézisében is részt vesz, valamint befolyásolja a kapszuláris poliszacharidok lipidáltságát és exportját is (Sharypova *et al.*, 2006) (Palvolgyi *et al.*, 2009).

A *S. meliloti* 1021-es törzs jellemzően egy alacsony molekulatömegű (LMW) Kdo homopolimer kapszuláris poliszacharidot termel (Sharypova *et al.*, 2006). Legújabb eredmények szerint a *S. meliloti* Rm41 törzsben az RkpY fehérje kapcsoló funkciót tölt be a kapszuláris poliszacharidok bioszintézisében: a kapszuláris poliszacharid termelést a K<sub>R5</sub> antigén irányába tolja el, hiányában a baktérium K<sub>R5</sub> antigén helyett Kdo homopolimert termel (Palvolgyi *et al.*, 2009).

### 3. A MUNKA ELŐZMÉNYEI

A lucerna növény inváziójához szükséges bakteriális gének megismerése érdekében számos olyan infekcióban hibás ( $\text{Inf}^-$ ) *S. meliloti* mutánst jellemeztek már, mely nem képes bejutni a növény belsejébe, így a szimbiózis kialakulása a gümőfejlődés korai szakaszában elakad. E mutánsok segítségével sikerült kimutatni, hogy a szimbiózis kialakulásának ebben a fázisában a baktérium sejtfelszíni poliszacharidjainak fontos szerep jut. Számos kutatócsoport írta le az exopoliszacharidok (EPS) szerepét az invázióban különböző rhizobium törzsek vonatkozásában (Jones *et al.*, 2007). A magyarországi rhizobium-lucerna szimbiózis kutatás fő baktérium modellje a *S. meliloti* 41 törzs, valamint ennek *exoB* variánsa, az AK631 törzs. Az AK631 baktériumok az *exoB* mutáció miatt EPS-t nem termelnek, mégis képesek szimbiózist kialakítani a gazdanövényeikkel. *S. meliloti* AK631 háttérben izolált  $\text{Inf}^-$  mutánsok genetikai analízise lehetővé tette a növény inváziójához elengedhetetlen törzsspecifikus kapszuláris poliszacharid, a  $\text{K}_{\text{R}5}$  antigén azonosítását, valamint bioszintézis génjeinek feltérképezését. A  $\text{K}_{\text{R}5}$  antigén tehát helyettesíteni tudja az exopoliszacharidokat a gümőfejlődés során (Putnoky *et al.*, 1990) (Petrovics *et al.*, 1993). A több *S. meliloti* törzsen végzett vizsgálatok arra utaltak, hogy a kapszuláris poliszacharidoknak akár elsődleges szerepük is lehet az infekciós folyamatban, szerkezetük meghatározhatja a gazdaspecifitást (Forsberg and Reuhs, 1997).

Ezek a kutatások rámutattak arra is, hogy a  $\text{K}_{\text{R}5}$  antigén szerepet játszhat a törzsspecifikus 16-3 fágfertőzésben is, ugyanis a  $\text{K}_{\text{R}5}$  antigén termelésben sérült baktérium mutánsok többsége rezisztenciát mutatott a 16-3 fággal szemben. (1. táblázat) (Putnoky *et al.*, 1988).

<i>S. meliloti</i> törzs	szimbiózisban mutatott fenotípus	16-3 fággal szemben mutatott fenotípus	$\text{K}_{\text{R}5}$ antigén
vad típus	$\text{Inf}^+$	szenzitív	a vad típusra jellemző $\text{K}_{\text{R}5}$ antigént termel
mutáns	$\text{Inf}^-$	rezisztens	a $\text{K}_{\text{R}5}$ antigén termelése sérült (nincs vagy módosult)

#### 1. táblázat : *S. meliloti* törzsek viselkedése a szimbiózisban és a 16-3 fággal szemben

Az  $\text{Inf}^+$  *S. meliloti* törzseket a 16-3 fág képes volt fertőzni, míg az  $\text{Inf}^-$  mutánsok egy része rezisztenciát mutatott a fággal szemben. A 16-3 fágrezisztens mutánsok a törzsspecifikus kapszuláris poliszacharid ( $\text{K}_{\text{R}5}$  antigén) termelésében sérültek.

Az esetek nagy részében a rezisztenciát a fág adszorpciójának elmaradása okozta. Ezek alapján feltételezték azt, hogy a K<sub>R5</sub> antigén receptorként szolgálhat a 16-3 fág számára. Ezek a felismerések odáig vezettek, hogy a 16-3 bakteriofágot szelekciós eszközként kezdték alkalmazni K<sub>R5</sub> antigén termelésben hibás baktérium mutánsok gyors izolálására (Petrovics *et al.*, 1993) (Putnoky *et al.*, 1990).

Ebbe a munkába kapcsolódtam be diplomadolgozóként, majd doktoranduszként Dr. Putnoky Péter vezetésével. Csoportunk célja a kapszuláris poliszacharid bioszintézisének vizsgálata, új gének feltérképezése, a szerkezetében rejlő gazdaspecifikus vonatkozások feltárása, továbbá a *S. meliloti* baktérium 16-3 fág általi fertőzése kulcsfontosságú elemeinek megismerése.

#### 4. CÉLKITŰZÉSEK

Munkámban az alábbi feladatokat tűztük ki célul:

- fágreceptor hibás *S. meliloti* baktériumok és a megváltozott receptorhoz alkalmazkodott *16-3 host range* fágmutánsok izolálása,
- a receptor és antireceptor mutációk azonosításával a baktérium-fág felismerésben részt vevő elemek feltérképezése,
- az *in silico* módszerekkel kiválasztott, feltehetően a *16-3* fágfarok felépítésében részt vevő gének azonosítása célzott mutagenézissel, a géntermékek funkciójának bizonyítása.

A mutációs elemzések eredményei új információkat szolgáltathatnak a fágfarok szintézisét irányító génekről, hozzájárulhatnak a fágfertőzés molekuláris mechanizmusának, valamint a fágok evolúciójának megértéséhez.

## 5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 5.1. Baktériumok, bakteriofágok, plazmidok

Munkám során használt baktérium és bakteriofág törzsek, valamint plazmidok és kozmidok jellemzőit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: Felhasznált baktériumok, bakteriofágok, plazmidok, kozmidok, transzpozonok

ELNEVEZÉS	JELLEMZŐK	REFERENCIA
<b><i>Sinorhizobium meliloti</i> törzsek:</b>		
RM41	<i>S. meliloti</i> 41 vad típusú	(Szende and Ördögh, 1960)
GH4046	RM41 <i>I6-3</i> fágra rezisztens, spontán mutáns	(Putnoky <i>et al.</i> , 2004)
GH4180	RM41 <i>I6-3</i> fágra rezisztens, spontán mutáns	(Putnoky <i>et al.</i> , 2004)
PP4073	AK631 <i>I6-3</i> fágra rezisztens, spontán mutáns	(Palvolgyi <i>et al.</i> , 2009)
AT313	AK631 <i>rkpZ::Tn5</i>	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
Rm41( <i>I6-3cti3</i> )	<i>I6-3cti3</i> profágot hordozó lizogén <i>S. meliloti</i> 41	(Orosz and Sik, 1970)
<u>munkám során létrehozott lizogén <i>S. meliloti</i> törzsek</u>		(Deak <i>et al.</i> , 2010)
AV293	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km9286</i> )	
AV547	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km10151</i> )	
AV377	Rm41( <i>I6-3cti3::Km10680</i> )	
AV406	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km11890</i> )	
AV294	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km12247</i> )	
AV407	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km12862</i> )	
AV334	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km13552</i> )	
AV360	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km13945</i> )	
AV335	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km14001</i> )	
AV337	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km14318</i> )	
AV336	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km15738</i> )	
AV403	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km17526</i> )	
AV402	Rm41( <i>I6-3cti3::ET-Km18260</i> )	
<b><i>Escherichia coli</i> törzsek:</b>		
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacZΔM15</i> Tc <sup>R</sup> klónozó törzs	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> klónozó törzs	(Hanahan, 1983)
PP211	<i>E. coli</i> JF1754 (pRK2013) Km <sup>R</sup> helper plazmid kozmid klónok és pBBR1MCS származékok konjugációjához	Putnoky Péter
PP4303	<i>E. coli</i> DH5α (pCU101) Cm <sup>R</sup> helper plazmid pPAG160 származékok konjugációjához	(Thatte <i>et al.</i> , 1985)

## Bakteriofágok:

16-3ΔNC	<i>S. meliloti</i> 41 törzsre specifikus 16-3 vad típusú fág lítikus úton szaporodó deléciós törzse	(Dorgai <i>et al.</i> , 1983)
16-3 h5	<i>S. meliloti</i> GH4046 törzsön izolált <i>host range</i> mutáns	(Putnoky <i>et al.</i> , 2004)
16-3 h105	<i>S. meliloti</i> GH4180 törzsön izolált <i>host range</i> mutáns	(Putnoky <i>et al.</i> , 2004)
16-3 h109	<i>S. meliloti</i> GH4180 törzsön izolált <i>host range</i> mutáns	(Putnoky <i>et al.</i> , 2004)
16-3 h182	<i>S. meliloti</i> AT313 törzsön izolált <i>host range</i> mutáns	(Deak <i>et al.</i> , 2010)
16-3 h842	<i>S. meliloti</i> PP4073 törzsön izolált <i>host range</i> mutáns	(Deak <i>et al.</i> , 2010)
16-3 h843	<i>S. meliloti</i> PP4073 törzsön izolált <i>host range</i> mutáns	(Deak <i>et al.</i> , 2010)

## Plazmidok és kozmidok:

### klónozáshoz használt plazmidok

pBluescriptIISK(+)	klónozó vektor (röviden pBS) Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pBBR1MCS-2	széles gazdaspecifitású konjugatív plazmid Km <sup>R</sup>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pBBR1MCS-5	széles gazdaspecifitású konjugatív plazmid Gm <sup>R</sup>	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pPAG160	rhizobiumban nem replikálódó konjugatív plazmid	(Ganyu <i>et al.</i> , 2005)
pCU999	kanamicin kazettát tartalmazó plazmid	(Papp and Iyer, 1995)

### rhizobium komplementációs kísérletekben használt kozmidok és plazmidok

pPP428	<i>rkp-1</i> régiót hordozó kozmid klón Tc <sup>R</sup>	(Putnoky <i>et al.</i> , 1990)
pAT330	<i>rkp-2</i> régiót hordozó kozmid klón Tc <sup>R</sup>	(Kereszt <i>et al.</i> , 1998)
pAT399	<i>rkp-3</i> régió bal oldalát tartalmazó kozmid klón Tc <sup>R</sup>	(Kereszt <i>et al.</i> , 1998)
pAT401	<i>rkp-3</i> régió jobb oldalát tartalmazó kozmid klón Tc <sup>R</sup>	(Kereszt <i>et al.</i> , 1998)
pPP4054	pAT399 <i>orf140::Tn5</i> (174)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pPP4055	pAT399 <i>rkpL::Tn5</i> (187)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pPP4056	pAT399 <i>rkpM::Tn5</i> (212)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pPP4049	pAT399 <i>rkpN::Tn5</i> (107)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pPP4053	pAT399 <i>rkpO::Tn5</i> (168)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pPP4048	pAT399 <i>rkpP::Tn5</i> (105)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pPP4051	pAT399 <i>rkpQ::Tn5</i> (124)	(Kiss <i>et al.</i> , 2001)
pMW23	<i>S. meliloti</i> 41 <i>rkpZ</i> klón	(Williams <i>et al.</i> , 1990)
pEN3265	pBBR1MCS-2 <i>Bam</i> HI:: <i>rkpY</i> 6 kb frag. Km <sup>R</sup>	(Palvolgyi <i>et al.</i> , 2009)

### host range fágok marker rescue kísérleteiben használt kozmidok és plazmidok

pDH1	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(O-H) fragmentjét hordozó kozmid	(Olasz <i>et al.</i> , 1985)
pDH79	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(L-F) fragmentjét hordozó kozmid	(Olasz <i>et al.</i> , 1985)
pDH114	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(K-A) fragmentjét hordozó kozmid	(Dorgai <i>et al.</i> , 1983)
pAV350	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(C) fragmentjét hordozó pBBR1MCS-2 származék	(Deak <i>et al.</i> , 2010)
pAV351	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(D) fragmentjét hordozó pBBR1MCS-2 származék	(Deak <i>et al.</i> , 2010)
pAV343	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(L) fragmentjét hordozó pBBR1MCS-2 származék	(Deak <i>et al.</i> , 2010)
pAV342	a 16-3 fág <i>Eco</i> RI(H) fragmentjét hordozó pBBR1MCS-2 származék	(Deak <i>et al.</i> , 2010)

16-3 fág transzpozonos és Km kazettás mutagenézise során létrehozott plazmidok (Deak *et al.*, 2010)

pAV283	a 16-3 fág <i>SalI</i> <sub>8860</sub> - <i>SalI</i> <sub>13175</sub> fragmentjét hordozó pBluescript származék
pPP4129	a 16-3 fág <i>EcoRI</i> (D) fragmentjét hordozó pBluescript származék
pAV381	a 16-3 fág <i>EcoRI</i> (L) fragmentjét hordozó pBluescript származék
pAV277	pAV283::ET-Km9286
pAV280	pAV283::ET-Km10151
pAV367	pBSΔ <i>EcoRI</i> , <i>SalI</i> - <i>NotI</i> ::16-3 <i>orf017 SalI-NotI</i> fragm.
pAV368	pAV367 <i>EcoRI</i> ::Km kazetta a pCU999-ből a 16-3 fág 11680 bp pozíciójában
pAV393	pPP4129::ET-Km11890
pAV278	pAV283::ET-Km12247
pAV391	pPP4129::ET-Km12862
pAV299	pPP4129::ET-Km13552
pAV323	pPP4129::ET-Km13945
pAV300	pPP4129::ET-Km14001
pAV302	pPP4129::ET-Km14318
pAV301	pPP4129::ET-Km15738
pAV385	pAV381::ET-Km17526
pAV384	pAV381::ET-Km18260
pAV288	pPAG160 <i>EcoRI</i> blunt::pAV277 blunt inszert
pAV271	pPAG160 <i>EcoRI</i> blunt::pAV280 blunt inszert
pAV370	pPAG160 <i>EcoRI</i> blunt::pAV368 <i>Acc65I-NotI</i> blunt
pAV395	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV393 <i>EcoRI</i> inszert
pAV290	pPAG160 <i>EcoRI</i> blunt::pAV278 blunt inszert
pAV394	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV391 <i>EcoRI</i> inszert
pAV305	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV299 <i>EcoRI</i> inszert
pAV344	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV323 <i>EcoRI</i> inszert
pAV307	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV300 <i>EcoRI</i> inszert
pAV311	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV302 <i>EcoRI</i> inszert
pAV309	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV301 <i>EcoRI</i> inszert
pAV398	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV385 <i>EcoRI</i> inszert
pAV399	pPAG160 <i>EcoRI</i> ::pAV348 <i>EcoRI</i> inszert

a 16-3 fág komplemetációs kísérletekhez létrehozott plazmidok

(Deak *et al.*, 2010)

pAV454	pBBR1MCS-5 <i>SalI</i> ::4,3 kb <i>SalI</i> fr ( <i>orf017, 018, 019</i> )
pAV564	pBBR1MCS-5 <i>ClaI-SmaI</i> ::1,3 kb <i>ClaI-PvuII</i> fr ( <i>orf018, 19</i> )
pAV556	pBBR1MCS-5 <i>SmaI</i> ::1,6 kb <i>PaeI-NotI</i> blunt fr ( <i>orf020</i> )
pAV555	pBBR1MCS-5 <i>SalI</i> ::0,9 kb <i>SalI</i> fr ( <i>orf021</i> )
pAV502	pBBR1MCS-5::3,2 kb <i>SphI-EcoRI</i> (37) fr ( <i>hI</i> gén)
pAV481	pBBR1MCS-5 <i>KpnI-EcoRI</i> :: 2580 bp hterU1primer- <i>EcoRI</i> (41) ( <i>hII</i> gén)
pAV482	pBBR1MCS-5 <i>KpnI-EcoRI</i> :: 2538 bp hterU2primer- <i>EcoRI</i> (41) ( <i>hII</i> gén)

**Transzpozonok:**

ET-Km<sup>R</sup>-3 Mu Entranceposon (F779), TGS-II kit

FINNZYMES



## 5.2. A baktériumok növesztése

A *S. meliloti* törzseket TA komplett (Orosz *et al.*, 1973) vagy GTS minimál (Kiss *et al.*, 1980) szilárd táptalajokon (1,5% agar), illetve TA tápfolyadékban 28-32 °C-on, az *E. coli* törzseket pedig LB (Sambrook *et al.*, 1989) tápközegben 37°C-on növesztettük. A táptalajok a megfelelő antibiotikumot a 3. táblázatban feltüntetett végkoncentrációban tartalmazzák.

3. táblázat: A tápközegekben alkalmazott antibiotikumok koncentrációi (µg/ml)

Antibiotikum	Rövidítés	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Tetraciklin	Tc	15	15
Kanamycin	Km	30	200
Ampicillin	Amp	200	–
Spektinomycin	Spc	50	–
Streptomycin	Sm	–	100

## 5.3. Plazmid DNS bejuttatása baktérium sejtekbe

### 5.3.1. Konjugáció

Rhizobium törzsekbe konjugációval juttattunk be plazmidokat. A keresztezni kívánt baktériumokat (donor, recípiens) és a konjugációt elősegítő „helper” plazmidot hordozó törzset felnövesztettük a megfelelő antibiotikumokat tartalmazó komplett táptalajon. A keresztezést 0,9%-os NaCl-oldatban felfuszpendált baktériumokkal végeztük, TA lemezen összecséppentve őket. 16-24 órás, 32 °C-on történő inkubálás után a felnőtt baktériumkolóniákat szuszpendáltuk, és a megfelelő szelektív lemezre szélesztettük tömény, illetve (-2) és (-4) hígításokban, majd legalább két lépésben tisztítottunk tovább telepeket.

### 5.3.2. Kompetens sejt készítése és transzformálása

Kompetens sejtek készítéséhez a transzformálni kívánt *E. coli* törzset 200 ml SOB tápfolyadékban (2% Bacto trypton, 0,5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, pH 7,0) 0,5-0,6 közötti optikai denzitás eléréséig (OD<sub>600</sub> nm) 22°C-on növesztettük, majd 10 percre jégre tettük a kultúrákat. A 10 perces centrifugálással (6000g) összegyűjtött sejteket 80 ml hideg TB pufferben (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7) szuszpendáltuk. A sejteket 10 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugálással ismét összegyűjtöttük, és 20 ml jéghideg TB pufferben szuszpendáltuk. A szuszpenzióhoz 1,5 ml DMSO-t adtunk, majd a kultúrát 500 µl-enként Eppendorf csövekbe osztottuk, és transzformációig -80°C-on tároltuk (Ish-Horowicz and Burke, 1981).

Azonnali felhasználásra úgynevezett gyors kompetens sejteket készítettünk. A sejteket 3 ml LB tápfolyadékban a megfelelő antibiotikumok mellett éjszakán át 32°C-on növesztettük, majd 10 ml SOB tápfolyadékban hígítottuk (OD<sub>600</sub> 0,05). További 3-4 óra, 37°C -os növesztés után (OD<sub>600</sub> 0,5-0,6-ig) 10 percre jégre tettük. Transzformálásonként 1,5 ml kultúrából centrifugálással (12000g, 1 perc) győjtöttük össze, majd 400 µl 0°C-os TB pufferben szuszpendáltuk a sejteket. Újabb centrifugálást követően a sejteket 100 µl TB pufferben vettük fel, majd 7 µl DMSO-t adtunk a szuszpenzióhoz. A sejteket azonnal transzformáltuk.

Egy transzformáláshoz 100-200 µl kompetens sejtet használtunk fel. A sejteket -80°C-ról jégre tettük, és 15 perc elteltével hozzáadtuk a transzformálandó DNS-t (1-10 µl). 20 percig jégen inkubáltuk, majd 3 perces 37°C-os hősokkot alkalmaztunk. A hősokk után 400 µl SOC oldatot (2% Bacto trypton, 0,5% Yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM glükóz, pH 7,0) adtunk a sejtekhez. Egy óra 37°C-os inkubáció után a sejteket szelektív táptalajra szélesztettük. pBluescript és pBBR1MCS-5 vektorba klónozásnál a táptalajba antibiotikumot, valamint 200 µM IPTG-t és 0,004 % Xgal oldatot (2% törzsoldat, dimetil-formamidban oldva) tettünk, és a megfelelő transzformánsokat kék-fehér screen segítségével válogattuk ki (Inoue *et al.*, 1990).

#### **5.4. Fágok szaporítása, fágtitrálás**

A felszaporítani kívánt fág egy tarfoltját 10 ml TA folyadékba vittük át, és 0,1 ml éjszakán át felnövesztett baktériumtörzs hozzáadása után a lombikot 32 °C-on, 12-24 órán át rázattuk. A fágizátumhoz 0,1 térfogatrész kloroformot adtunk, majd meghatároztuk a fágszámot (titer) úgy, hogy 0,1 ml megfelelően hígított fágot, 0,1 ml éjszakán át felnövesztett baktériumot és 4 ml TA fedőagart (0,8% agart tartalmazó ún. lágy agar) összekeverve TA lemez tetejére rétegeztünk. A lemezeket 12-24 órás, 32 °C-on történő inkubálás után értékeltük ki. A lizátumok általában 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> fágreszecskeket tartalmaztak milliliterenként (pfu/ml). A lizátumokat 2-8 °C-on tároltuk.

#### **5.5. Fágérzékenységi teszt**

A vizsgálni kívánt friss baktériumkultúra 0,1 ml-ét tartalmazó TA fedőagar felszínének egy adott pontjára 10 µl (kb. 10<sup>8</sup> fág) lizátumot cseppentettünk, és 24 órás inkubációs idő után vizsgáltuk, hogy a cseppentés helyén bekövetkezett-e a lízis.

## 5.6. Fágkötési teszt

Körülbelül  $10^8$  baktériumhoz  $10^5$  fágreszecskét adtunk, 5 percig szobahőn inkubáltuk, majd a sejteket és az általuk megkötött fágreszecskéket 20 mp-es centrifugálással (12000g) centrifugálással leüleptítettük, végül titrálással meghatároztuk a felülúszóban maradt (nem kötött) fágreszecskék számát.

## 5.7. Hőmérséklet-érzékenységi (*shift up/shift down*) kísérletek

A *S. meliloti* 41 sejt kultúrát és a *h109* fág lizátumot felmelegítettük a fág restriktív hőmérsékletére (37 °C). Körülbelül  $10^8$  sejthez  $10^5$  fágreszecskét adtunk, majd a párhuzamos kultúrákat eltérő ideig (5, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 percig) 37 °C-on rázattuk. Ezután a kultúrát permisszív hőmérsékleten (28 °C) növesztettük tovább a teljes fágciklus lezajlásának biztosításához, a fertőzés pillanatától számítva 180 percig. Az egyes lizátumok fág hozamát a 180 percig 28 °C-on növesztett kontrollal hasonlítottuk össze.

## 5.8. Marker rescue kísérletek

A *h109* és a *h843* hőmérséklet-érzékeny mutációk lokalizálásához a mutáns fágokat olyan *S. meliloti* 41 származékokon növesztettük, melyekbe előzőleg konjugációval bejuttattuk a vad fág genom különböző szakaszait hordozó plazmidokat. A 180 percig 28 °C-on növesztett, egy lépéses lizátumok mindegyikéből 2-2 párhuzamos titrálást végeztünk *S. meliloti* 41 baktérium pázsiton. A párhuzamos lemezek egyikét permisszív hőmérsékleten (28 °C) inkubáltuk, ezzel a teljes fág hozamot határoztuk meg. A másik lemezt restriktív hőmérsékleten (37 °C) inkubáltuk, ezzel meghatároztuk a 37 °C-on plakkot képező vad típusú rekombinánsok és revertánsok számát. A spontán reverzió gyakoriságának megállapításához a fág mutánsokat üres vektort tartalmazó *S. meliloti* 41 baktériumon növesztettük, majd a továbbiakban a fentiek szerint jártunk el.

## 5.9. Fágreszecskék tisztítása

Nagyobb térfogatú, magas titerű fág lizátumot úgy hoztunk létre, hogy 1 ml éjszakán át növesztett baktérium kultúrával oltottunk be 200 ml TA tápfolyadékot, majd OD<sub>600</sub> 0,5 körüli értékig növesztettük (kb. 3-4 óra). A sejt kultúrákat ezután  $10^{10}$  pfu fágreszecskével fertőztük, és folytattuk a rázatást a teljes lízisig (3 óra a fertőzéstől), végül 10 ml kloroformot adtunk a lizátumokhoz.

Az inszerciós fágmutánások esetében a következők szerint hoztunk létre nagy térfogatú lizátumot. A hőmérséklet-érzékeny C fágrepresszor (Rm41 *I6-3cti3* törzsek és származékai) mindaddig biztosította a lizogénia fennállását, míg a lizogén baktériumokat 30 °C alatti hőmérsékleten tartottuk. A lítikus út indukálásához az éjszakán át 28 °C-on növesztett folyadékkultúrákat centrifugáltuk (10 perc, 6000g), a sejteket 200 ml friss tápfolyadékban szuszpendáltuk, további 2 órán keresztül 28 °C-on ráztuk, majd 20 percig 37°C-on inkubáltuk, kiváltva ezzel a profág indukciót. A fágciklus teljes lezajlásához a folyadékkultúrákat további 180 percig 28 °C-on ráztuk, végül 10 ml kloroformot adtunk a lizátumokhoz.

A lizált baktériumsejtek nukleinsavának elemésztése céljából a lizátumokat 1 µg/ml végkoncentrációjú DNáz és RNáz enzimmel 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően szilárd NaCl-ot (1M végkoncentrációban) adtunk a lizátumokhoz, ezzel elősegítve a fágreszecskek disszociálását a baktériumtörmelékekről, megkönnyítve a fágok PEG-es kicsapását. A sejttörmelékeket centrifugálással (15 perc, 6000g) ülepítettük le. A felülúszóhoz 10% szilárd polietilén-glikolt (PEG8000) adtunk, melyet lassú keverés mellett oldottunk, majd a lizátumokat jégen inkubáltuk egy éjszakán át. A kicsapódott fágreszecskeket centrifugálással ülepítettük (20 perc, 6000g, 4°C). A csapadékot 4 ml SM pufferben (100mM NaCl, 20mM Tris, 5mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub> pH7,5) szuszpendáltuk, majd 4 ml kloroform hozzáadásával kicsaptuk a maradék sejttörmeléket és a PEG-et, 30 mp óvatos rázogatós mellett. 15 perc centrifugálást követően (4000g, 4 °C) a fágreszecskeket tartalmazó vizest fázist (kb. 8 ml) leszívtuk tiszta csőbe.

A vizes fázist előkészítettük a cézium-klorid lépcsőzetes ultracentrifugáláshoz. Az oldat minden 1 ml-éhez 0,5 g CsCl-t adtunk (így  $\rho=1,15$  g/ml sűrűségű oldatot kaptunk).

A CsCl lépcsőzetes grádiens úgy alakítottuk ki a centrifugacsőben, hogy 5-5 ml  $\rho=1,45$  g/ml,  $\rho=1,5$  g/ml és  $\rho=1,7$  g/ml sűrűségű oldatot rétegeztünk óvatosan egymás alá, majd ennek tetejére vittük fel a  $\rho=1,15$  g/ml sűrűségű fágoldatot, illetve ugyanilyen sűrűségű oldattal végeztük a tárázást. A megadott sűrűségű 100 ml oldat készítése az alábbiak alapján történt (Sambrook *et al.*, 1989):

Sűrűség $\rho$ (g/ml)	CsCl (g)	SM puffer (ml)	Refraktív index $\eta$
1,45	60	85	1,3768
1,50	67	82	1,3815
1,70	95	75	1,3990

A mintákat 2 órán keresztül, 30000g-vel, 4°C-on centrifugáltuk, majd az 1,5 és 1,45 g/ml sűrűségű rétegek határán összegyűlt kékes-opálos gyűrűt (kb. 2 ml) mikropipettával leszívtuk. A CsCl-ot Spectra Pore, 6-8000 Da alatti molekulákat átengedő dializáló membrán alkalmazásával távolítottuk el, százszoros térfogatú SM pufferben, szobahőmérsékleten, lassan kevertetve (háromszor cserélve az SM puffert, az utolsót egy éjszakán át 2-8 °C-on).

#### **5.10. Fágrészecskék elektronmikroszkópos vizsgálata**

A 3 mm átmérőjű réz tárgytartórácsokat (gridek, 300 vagy 400 lukú) formvar (polyvinyl formol) hártyával vontunk be úgy, hogy tárgylemezt helyeztünk függőlegesen a formvar oldatba (0,5% kloroformos oldat) 10 másodpercig, a tárgylemezen kialakult hártyát pengével körbevágtuk, desztillált víz felszínére úsztattuk, ráhelyeztük a grideket, majd a hártyánál nagyobb parafilm lap segítségével a víz felszínéről leemeltük a hártyával összetapadt grideket. A gridek körül finom csipesz hegyével körbevágtuk a formvar hártyát. Mintafelvételhez a hártyával bevont grideket egy csepp CsCl-grádiens centrifugálással tisztított, dializált fágizátumon úsztattuk 5 percig, a felesleges folyadékot filterpapírral leitattuk, majd a preparátumokat negatívan festettük 3% foszfovolframsavval (PTA  $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$  pH 6,6) 40 másodpercig. Filter papírral leitattuk a felesleget, majd a grideket szobahőmérsékleten szárítottuk. A preparátumokat JEOL 1200 EXII transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a PTE ÁOK Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumában. A készített felvételek negatívjait digitalizáltuk.

#### **5.11. Plazmid DNS izolálás**

A megfelelő antibiotikum jelenlétében éjszakán át növesztett sejtekből Ish-Horowicz és Burke (Ish-Horowicz and Burke, 1981) szerint alkalikus lízissel preparáltuk a plazmidokat. 1,5 ml kultúrát Eppendorf csőbe tettünk, a sejteket centrifugálással üleptítettük (12000g, 30 mp). A sejteket 100 µl TEG oldatban (25 mM TrisHCl, 10 mM EDTA, 50 mM glükóz pH 8,0) szuszpendáltuk. A feltárást óvatos keverés mellett 200 µl NS oldat (0,2N NaOH, 1% SDS) hozzáadásával végeztük. A mintákat 5 percig 0°C-on inkubáltuk, majd erős rázással 160 µl jéghideg Na-acetát oldatot (3M, pH 4,8) adtunk hozzájuk. 5 perces 0°C-os inkubáció után 5 percig centrifugáltuk (12000g), és a felülúszóból 400 µl izopropanollal kicsaptuk a plazmid DNS-t. 10 perc -20°C-os inkubáció után a csapadékot lecentrifugáltuk (5 perc, 12000g) és szárítottuk. A csapadékot 100 µl Tris-pufferben (50 mM TrisHCl, 100 mM Na-acetát, pH 8,0) oldottuk fel, majd 200 µl etanollal ismét kicsaptuk. 10 perc 0°C-os inkubáció után a

csapadékot centrifugáltuk, szárítottuk, majd 30-50 µl RNáz-os desztillált vízben (100 µg/ml RNázA) oldottuk fel.

A DNS-szekvenáláshoz, valamint a transzpozíciós reakciókhoz szükséges volt a DNS-preparátum további tisztítása. A plazmid DNS izolálása végén 50 µl RNáz-os desztillált vízben vettük fel a csapadékot, majd 0,1 térfogat 10% SDS és 1 térfogat 7,5 M NH<sub>4</sub>-acetát hozzáadása után 15 percig inkubáltuk jégen. Ezután centrifugáltuk 5 percig (12000g), és a felülúszót új csőbe pipettáztuk. Ehhez 0,6 térfogat izopropanolt adtunk és -20°C -ra tettük min. 20 percre. Az inkubálás után 400 µl 70%-os etanolos mosás és szárítás következett. A csapadékot 30-40 µl steril desztillált vízben vettük fel.

### **5.12. Fág DNS izolálás**

A szükséges mennyiségű DNS oldatot 20 ml TA tápfolyadékban egész éjszakán át növesztett bakteriofágból ( $10^9$ - $10^{10}$  pfu/ml) izoláltuk. 1,5 ml kultúrát Eppendorf csőbe mértünk, és a sejteket centrifugálással üleptettük (1 perc, 12000g). A felülúszót új csőbe átpipetázva 300 µl PEG/NaCl (20% PEG 6000, 2,5M NaCl) oldattal kevertük össze. Ezután a mintákat 15 percig jégen inkubáltuk, majd újra lecentrifugáltuk (5 perc, 12000g). Az üledéket 50 µl TE (50mM Tris, 20mM EDTA, pH 8,0) oldatban szuszpendáltuk, majd 0,1 térfogat 10 % SDS oldatot adtunk hozzá. Az elegyet 1 térfogat 7,5 M hűtött ammónium-acetáttal kevertük össze. 15 perces, 0 °C-on történő inkubáció után a csapadékot lecentrifugáltuk (5 perc, 12000g), majd a felülúszót új csőbe mérve 0,6 térfogat izopropanollal csaptuk ki a DNS-t. A mintákat 15 percig -20 °C-on inkubáltuk, majd 5 percig centrifugáltuk (12000g). Ezután a csapadékot 400 µl 70 %-os etanollal mostuk, szárítottuk, majd 25 µl steril desztillált vízben oldottuk fel. Az izolálás sikerességét restrikciós endonukleázokkal történő DNS emésztés után agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az emésztés során 5 µl bakteriofág DNS mintát használtunk.

### **5.13. Emésztés restrikciós endonukleázokkal, ragadós végek feltöltése**

A DNS minták restrikciós endonukleázokkal történő vágását Sambrook és munkatársai szerint végeztük (Sambrook *et al.*, 1989), az enzimekhez ajánlott pufferközegben, követve a gyártó előírásait (Fermentas). Amennyiben kettős emésztés esetén a két enzim optimális puffere nem egyezett meg, az első enzimreakció után a minta DNS tartalmát kicsaptuk 0,1 térfogat 3M Na-acetát (pH 7,0) és 2 térfogat etanol (96%) hozzáadásával. Minimum 20 perces, -20°C-on történő inkubálás, majd 5 perc centrifugálás (12000g) és 70% etanolos

mosás, szárítás után 30µl desztillált vízbe vettük fel a csapadékot. Ezután végeztük el a második enzimreakciót. Bizonyos esetekben a DNS fragmenteket T4 DNS polimeráz reakcióval tompa végűvé alakítottuk a gyártó által megadott protokoll alapján (Fermentas).

#### **5.14. Agaróz gélelektroforézis**

A DNS-fragmentek elválasztását agaróz gélelektroforézis alkalmazásával végeztük (Sambrook *et al.*, 1989). Az elválasztásra szánt fragmentek méretétől függően 0,6-1,2%-os agarózt gélt használtunk, melynek összeállítása: 0,6-1,2 g agaróz, 100 ml 1xTBE puffer, 100 µl etidium-bromid (100 µg/ml). Az 1xTBE futtatópuffert 5xTBE törzsoldatból hígítottuk, melynek összetétele: 54 g TRIS, 27,5 g bórsav, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) / 1000 ml-re kiegészítve desztillált vízzel.

Az elválasztásra szánt DNS mintához az alábbiakban leírt összetételű mintafelviteli, ún. STOP-oldatot adtunk (5xSTOP-ból a végtérfogat 1/5-ét): 5xSTOP (20 ml-hez): 2 g ficoll, 10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 40 mg brómfenolkék.

A gélelektroforézist 40-100 V feszültségen végeztük, 7-12 cm géleket alkalmazva. Kontrollként *Pst*I enzimmel emésztett, λ fág DNS-t alkalmaztunk.

#### **5.15. DNS fragmentek izolálása agaróz gélből**

A PCR reakcióval és restrikciós emésztéssel előállított DNS fragmenteket agaróz gélelektroforézis segítségével tisztítottuk. 2-3 órás elválasztást követően az izolálni kívánt fragment elé a gélbe Whatman DE 81 papírt tettünk és 20 perces, 60V feszültség melletti elektroforézissel az izolálandó fragmentet a papírra futtattuk. A papírt eppendorf csőbe tettük, és a DNS-t 100 µl 1M NaCl oldattal mostuk le, kétszer egymás után. A DNS kicsapása 20 µl 3M Na-acetát oldattal (pH 7,0) és 120 µl izo-propanollal történt. A csapadékot 20 perces - 20°C-os inkubálás után centrifugáltuk (5 perc, 12000g), 400 µl 70% etanollal mostuk, majd ismételt centrifugálás (5 perc, 12000g) és szárítás után 20 µl steril desztillált vízben oldottuk fel.

#### **5.16. Ligálási reakció**

A ligálási elegyet 20 µl végtérfogatban, vektor DNS oldat, fragment DNS oldat, desztillált víz és ligáz puffer (5xkoncentráció: 200 mM TrisHCL, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM dithiotreitol, 2,5 mM ATP, pH 7,8) felhasználásával készítettük. A reakcióhoz T4 DNS ligázt

használtunk, és az elegyet legalább 2 óráig szobahőmérsékleten, vagy egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk.

### 5.17. Polimeráz láncreakció (PCR, *polimerase chain reaction*)

A PCR reakció összeállítása az alábbiak szerint történt:

4xPCR Mix törzsoldat	6 µl
Minta (templát) DNS	1-5 µl
Steril desztillált víz	9-14 µl
Felső primer	1 µl
Alsó primer	1 µl
Taq polimeráz	1 µl
<hr/>	
Végtérfogat:	24 µl

A 4xPCR Mix törzsoldat összetétele:	végkoncentráció a reakcióban:
4xTaq puffer	1x
0,8 mM dNTP	0,2 mM
6 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM

Minta DNS-ként leggyakrabban tisztított plazmid preparátumot vagy fág DNS preparátumot használtunk. Gyors ellenőrzésekhez megfelelő volt a tesztelendő baktérium 1 telepét 50 µl steril desztillált vízben szuszpendálni, és ennek 1 µl-ét vinni templátként a PCR reakcióba (ún. kolónia PCR).

A primerek 20 µM-os törzsoldatát használtuk, így a reakció 830 nM mennyiségben tartalmazta mindkét primert. A felhasznált primerek bázissorrendjét és a felhasználás célját a 4. táblázat foglalja össze.

Az automatizált polimerizációt az alábbi programbeállítások szerint végeztük:

1. 94 °C 2 perc
2. 94 °C 30 másodperc
3. 55-65 °C 30 másodperc (a primerpár T<sub>m</sub> hőmérsékleteitől függően)
4. 72 °C 1 perc
5. 35x go to step 2.
6. 20 °C 1 perc
7. end



#### 4. táblázat: Felhasznált primerek és a felhasználás célja

(1) az aláhúzott részek a klónozáshoz tervezett extra *KpnI* restrikciós enzim hasítóhelyet jelölik

(2) a jelölt primereket felhasználtuk az ET-Km inszerciók beépülésének ellenőrzésére is (PCR)

Primer	Nukleotid szekvencia (5'-3')	Felhasználás
h31	GCGGGCTGCAAAATCCAGA	<i>hI</i> gén felsokszorozása (PCR) és szekvenálása <sup>(2)</sup>
h51	CAACTGCCGCGGAGATGG	<i>hI</i> gén szekvenálása <sup>(2)</sup>
h32	CCGCCAGAAACGACTTCC	<i>hI</i> gén szekvenálása <sup>(2)</sup>
h52	GCCATTGCCCGATGAGG	<i>hI</i> gén szekvenálása
h33	TCACCAACCGCCGAATGCTC	<i>hI</i> gén szekvenálása <sup>(2)</sup>
h53	AGTTCGGCGCCATCCACGAC	<i>hI</i> gén felsokszorozása (PCR) és szekvenálás <sup>(2)</sup>
hterU1	<u>GGTACCC</u> CACCCGCCGACAGC <sup>(1)</sup>	pAV481 konstrukció létrehozása
hterU2	<u>GGTACCGCGCGGGCTTTTCTTTA</u> <sup>(1)</sup>	pAV482 konstrukció létrehozása <sup>(2)</sup>
L1U	ACTGGATGTTGCTGGTTTG	<i>hII</i> gén felsokszorozása (PCR) és szekvenálás <sup>(2)</sup>
L1L	GGTAGGCACTGTCCGTCTCG	<i>hII</i> gén felsokszorozás (PCR) és szekvenálás <sup>(2)</sup>
L2U	CTCTCCAATAAAACGACAGC	<i>hII</i> gén szekvenálása
L3U	GATAAAGGTCAAAGGTCTCG	<i>hII</i> gén szekvenálása
L2L	GATACCATACTCTTCGTTAGC	<i>hII</i> gén szekvenálása <sup>(2)</sup>
L3L	AGTTGTAGATCACCACCGAG	<i>hII</i> gén szekvenálása <sup>(2)</sup>
D2533	GGCGGCGGACGACGAGTTCT	ET-Km inszerció beépülés ellenőrzése (PCR)
pBSrev	AACAGCTATGACCATG	ET-Km inszerció beépülés ellenőrzése (PCR)
MuEnd	GTTTTTCGTGCGCCGCTTCA	ET-Km inszerció beépülés ellenőrzése (PCR) <sup>(2)</sup>
SeqE	CGACACACTCCAATCTTTCC	ET-Km inszerció beépülés ellenőrzése (szekv.)
SeqW	GGTGGCTGGAGTTAGACATC	ET-Km inszerció beépülés ellenőrzése (szekv.)
pag51	GCTTGCGAGGGTGCTACTTA	pPAG160 jelenlétének/hiányának tesztelése
pag31	CGGTTACGAGATCCATTTGCT	pPAG160 jelenlétének/hiányának tesztelése
omega51	GCGCGATTTTGCCGGTACT	pPAG160 jelenlétének/hiányának tesztelése
omega31	GATGTTACGCAGCAGGGCAGTC	pPAG160 jelenlétének/hiányának tesztelése

### 5.18. DNS-szekvencia meghatározás

Az izolált PCR fragmenteket, valamint a tisztított plazmid klónokat DNS-szekvencia meghatározás céljából a MTA Szegedi Biológiai Központ DNS Szekvenáló Laboratóriumába küldtük el. A DNS-szekvencia meghatározás BigDye terminátor kit alkalmazásával, Applied Biosystems 373A szekvenáló készüléken történt (Perkin Elmer, Wellesley, MA USA). A szekvenálási reakcióhoz felhasznált oligonukleotidokat a 4. táblázat foglalja össze.

### 5.19. *In vitro* transzpozonos és kanamicin kazettás mutagenézis

Az inszerciós fágmutánsok létrehozásához a mutagenizálni kívánt 16-3 fág DNS-t pBluescriptII SK(+) vektorba építettük, az alábbiak szerint:

1. pAV283 pBluescript *SalI* :: 16-3 *SalI*<sub>8860</sub>-*SalI*<sub>13175</sub> fragment (4,3 kb hosszúságú fragment, mely lefedi az *orf017*, *orf018a*, *orf018*, *orf019* és az *orf020* egy részét)
2. pPP4129 pBluescript *EcoRI* :: 16-3 *EcoRI*<sub>10680</sub>-*EcoRI*<sub>16822</sub> (6,1 kb D fragment, az *orf017* második felétől az *orf023=hII* gén első részét fedi le)
3. pAV381 pBluescript *EcoRI* :: 16-3 *EcoRI*<sub>16822</sub>-*EcoRI*<sub>18396</sub> (1,5 kb L fragment, az *orf023=hII* gén második részét fedi le)

Az inszerciós mutagenézist a FINNZYMES által kifejlesztett kit (Template Generation System<sup>TM</sup> II) segítségével végeztük. Az *in vitro* rendszerben a *MuA* transzpozáz enzim felhasználásával véletlenszerűen kanamicin rezisztencia markert tartalmazó entranszpozon (F779, nagysága 1195 bp) építhető be a mutagenizálandó DNS-be (Haapa *et al.*, 1999). A fenti plazmidszármazékokat az *E. coli* XL1Blue sejtekből tisztítottuk, majd GeneQuantII fotométer segítségével megmértük a minták DNS-koncentrációját. A reakcióhoz szükséges DNS mennyiséget a target DNS hossza alapján a receptben leírtak szerint (40 ng DNS/kb) állapítottuk meg. A kívánt térfogatú DNS mintához (általában 1-3 µl) 4 µl 5x puffert, 1 µl kanamycin rezisztenciagént hordozó entranszpozont (F779), 1 µl *MuA* transzpozáz enzimet adtunk, majd desztillált vízzel 20 µl-re egészítettük ki az elegyet. A mintákat 1 órán át 30°C-on inkubáltuk, ezután 10 percig 75°C-on inaktiváltuk az enzimet, majd a reakcióelegy 5 µl-ével XL1Blue kompetens sejteket transzformáltunk. A mutagenizált klónokra Amp+Km antibiotikumokat tartalmazó LB lemezekon szelektáltunk.

Több klónt tesztelve válogattuk ki a számunkra megfelelő pozícióba épült entranszpozont tartalmazókat. Az entranszpozon inszerciók körülbelüli helyzetét előbb

fizikai térképezéssel és PCR reakciók segítségével határoztuk meg. Ez utóbbiban felhasználtuk az entranszpozon végeire tervezett (a TGSII kitben lévő) MuEnd primert, a vektorra specifikus reverz, valamint a *16-3* specifikus primereinket (4. táblázat). Végül a megfelelőnek tűnő inszerciók beépülését bázispár pontossággal, DNS szekvenálással határoztuk meg, felhasználva a TGSII mutagenézis kit SeqE vagy SeqW primereit, melyek az entranszpozonról kifelé irányuló leolvasást tesznek lehetővé. Az inszerciókat a beépülés pozíciója alapján neveztük el (5. táblázat).

Egy inszerciót (10680-as az *orf017*-ben) célzottan a 10680. bp pozíciójú *EcoRI* helyen hoztunk létre úgy, hogy a pCU999 plazmidből (Papp and Iyer, 1995) származó, 1,2 kb hosszúságú kanamicin rezisztencia gént tartalmazó kazettát direkt módon építettük be (ezzel a kódolt fehérje feltételezett endolysin doménjét kívántuk elrontani). Ehhez az *orf017*-t lefedő *SalI-NotI* fragmentet kivágtuk a pAV283 konstrukcióból, és olyan pBluescript vektor *SalI-NotI* helyére építettük (pAV367), melyben előzőleg az *EcoRI* helyet elrontottuk (*EcoRI* vágás után tompa végűvé tettük, majd újra ligáltuk). Ez után az inszert *EcoRI* helyére építettük a pCU999 plazmidből *EcoRI* hasítással kapott kanamicin kazettát (pAV368).

Ezt követően pPAG160 vektorba építettük át a már ismert pozícióban inszerciót tartalmazó fragmenteket: a pAV283 származékoknál *SalI* emésztést követően tompa végeket hoztunk létre és *EcoRI*-gyel hasított, majd tompa végűvé alakított pPAG160 vektorba építettük; a másik két esetben (pPP4129 és pAV381 származékok) pedig az *EcoRI* fragmenteket a pPAG160 *EcoRI* helyére vittük be. A kanamicin kazettát tartalmazó inszertet *Acc65I-NotI* kettős emésztéssel tudtuk egy fragmentként kivágni, majd a végek tompává tétele után pPAG160 *PvuII* helyére építeni (pAV370).

Az inszerciós mutagenézis munkafolyamata során létrehozott törzseket az 5. táblázat foglalja össze.

**5. táblázat: Az inszerciós mutagenézis munkafolyamata során létrehozott törzsek**

A pBluescript származék oszlopban a felső index az inszerció létrehozásának módjára utal. (1-3) kanamicin entranszpozon inszerciók: (1) a pAV283 mutagenézisével előállítva, (2) a pPP4129 mutagenézisével előállítva, (3) a pAV381 mutagenézisével előállítva; (4) kanamicin kazettás inszerció (részletesen lsd. a szövegben).

Inszerció száma	Elrontott <i>orf</i>	pBluescript származék	pPAG160 származék	Rm41( <i>16-3cti3</i> ) inszerciós lizogén
9286	017	AV277 <sup>(1)</sup>	AV288	AV293 a
10151	017	AV280 <sup>(1)</sup>	AV271	AV547 a, b
10680	017	AV368 <sup>(4)</sup>	AV370	AV377
11890	018a	AV393 <sup>(2)</sup>	AV395	AV406
12247	018	AV278 <sup>(1)</sup>	AV290	AV294 a, b
12862	020	AV391 <sup>(2)</sup>	AV394	AV407
13552	021	AV299 <sup>(2)</sup>	AV305	AV334 c
13945	<i>hI</i> (022)	AV323 <sup>(2)</sup>	AV344	AV360 a, b
14001	<i>hI</i> (022)	AV300 <sup>(2)</sup>	AV307	AV335 b, c
14318	<i>hI</i> (022)	AV302 <sup>(2)</sup>	AV311	AV337 a, c
15738	<i>hI</i> (022)	AV301 <sup>(2)</sup>	AV309	AV336 a, b
17526	<i>hII</i> (023)	AV385 <sup>(3)</sup>	AV398	AV403 b
18260	<i>hII</i> (023)	AV384 <sup>(3)</sup>	AV399	AV402 a

**5.20. 16-3 inszerciós fágmutánsok létrehozása**

Az előző (5.19.) fejezetben leírt módon létrehozott pPAG160 származékokat konjugációval *S. meliloti* olyan lizogén törzsébe juttattuk, mely hőmérséklettel indukálható profágot tartalmaz (*16-3cti3*). A pPAG160 vektor rhizobium sejtekben nem replikálódik, így konjugációt követően a Km-rezisztens (inszerciós) és egyúttal Spc-szenzitív (pPAG160 rezisztencia markere) kolóniákra szelektálva kaptuk meg azokat a lizogéneket, melyekben a plazmidon bevitt inszerció homológ rekombinációval beépült a profág megfelelő szakaszára, és a vad típusú fág szekvencia a pPAG160 vektorral együtt elveszett. A pPAG160 vektorra tervezett 2 primerpár segítségével PCR reakciókban is meggyőződünk a vektor hiányáról (a pag51/pag31 primerpár a vektor pSC101 régiójára, míg az omega51/ omega31 primerpár a vektor Omega fragmentjére specifikus, a primerek szekvenciáját a 4. táblázat tartalmazza). Az inszerció beépülését szintén különféle PCR reakciókkal is teszteltük, melyekben felhasználtuk a MuEnd primert valamint *16-3* specifikus primereket, többféle kombinációban.

A mutáns profágok kivágódását úgy indukáltuk, hogy a lizogén kultúrákat 30 perces, 37 °C-os hősooknak vetettük alá, majd további 180 percig 28 °C-on növesztve lehetőséget biztosítottunk a fágciklus lezajlásához.

Az inszerciós mutagenézis munkafolyamata során létrehozott törzseket az 5. táblázat foglalja össze (ld. még az 5.1. fejezetben).

### 5.21. Fehérjék elválasztása MOPS-SDS poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazásával

A tisztított fágpreparátumok fehérjeinek elválasztását NuPAGE Novex Bis-Tris gélelektroforézis rendszerben végeztük (Invitrogen), a gyártó által biztosított gélek és pufferek alkalmazásával. Gyárilag elkészített 8x8 cm-es, 4-12% grádiens akrilamid/bis-akrilamid alapú, Bis-Tris-HCl (Bis-2-hydroxyethyl imino-tris-hydroxymethyl-methane-HCl) pufferelt géleket, és MOPS SDS alapú (3-N-morpholino propane sulfonic acid, valamint sodium-dodecil-sulfate) futtatópuffert használtunk.

A minták előkészítése (20µl/zseb):

4x LDS (lítium-dodecil-szulfát) mintapuffer	5 µl
10x redukálószer (0,5M DTT-dithiothreitol)	2 µl
minta + nagy tisztaságú víz	13 µl

---

70 °C, 10 perc

Molekulaméret markerként a MultiMark Multi-Colored Standard-ot használtuk (Novex).

A gél és a pufferek pontos összetétele a gyártó dokumentációjában megtalálható (Invitrogen, NuPAGE Bis-Tris Gel Instruction Booklet).

Az elektroforézist 200 V konstans feszültségen 1 órán keresztül végeztük, majd a géleket festettük (Simple Blue Safestain, Invitrogen), vagy Western blotthoz használtuk fel.

### 5.22. Western blot és N-terminális aminosavsorrend meghatározás

A gélben elektroforézissel szétválasztott fehérjéket elektroblottolással PVDF (polivinil-difluorid) membránra juttattuk át. Az Xcell II Blot Module és a NuPAGE transzfer puffer rendszert (Invitrogen) használtuk, mindenben követve a gyártó utasításait. A blottolást 30V-on, 2 órán keresztül végeztük. A membránra került fehérjesávokat 0,1 % Coomassi R-250 festéssel tettük láthatóvá, és további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

A PVDF membránokban lévő meghatározott fehérjesávok N-terminális aminosavszekvencia-meghatározását kooperációs munkában Buzás Zsuzsanna végezte, Edman degradáción alapuló technikával (Applied Biosystems 471 modell protein szekvenáló műszer segítségével).

### **5.23. KPS-LPS preparálás és elválasztás DOC poliakrilamid gélelektroforézissel**

A sejtfelszíni poliszacharidok tisztítása forró fenolos extrakcióval és ezt követő dialízissel történt (Kiss and Kondorosi, 1997). Az egy éjszakán át növesztett baktérium kultúrából 1,5 ml-t centrifugálással üleptítettünk, majd a sejteket 500 µl steril desztillált vízben szuszpendáltuk. 500 µl fenol hozzáadása után a mintákat összeráztuk, majd 15 percig 65°C-on inkubáltuk, 5 percenként megkeverve. A centrifugálást követően a vizes fázist dializáló csőbe mértük, és kétszer hat órán keresztül csapvízben, majd hat órán át desztillált vízben dializáltuk tovább. Ezt követően a mintákat liofilizálással beszárítottuk, végül a preparátumokat 100 µl steril desztillált vízben vettük fel.

A futtatáshoz 10 µl tisztított KPS-LPS mintát és 10 µl, 2x Sample puffer és futtató puffer 2:1 arányú keverékéből készített minta puffert mértünk össze, melyből 3-5 µl vittünk fel gélre. (2x Sample puffer: 100mM Tris (pH=6,8), 20 % glicerol, 2 % DOC, 2 mM EDTA, 10 % β-merkaptóetanol, 0.002 % Bromphenol Blue.) A mintákat 18 %-os DOC-poliakrilamid gélen futtattuk, majd BioRad Miniprotean II készüléken analizáltuk. A gélhez a következő törzsoldatokat készítettük el: (A oldat) 40 % akrilamid, 0,8 % bisz akrilamid; (B oldat) 22,1 g TRIS/100 ml desztillált víz pH=8,8; (C oldat) 7,69 g TRIS/100 ml desztillált víz pH=6,8; (D oldat) 2.5 % dezoxikolsav (DOC). A szeparáló gél 4,5 ml „A”, 2 ml „B”, 2 ml „D” oldatot és 1,5 ml desztillált vizet tartalmazott. A polimerizációt 17,5 µl 10 %-os ammónium-perszulfát (APS), és 8,75 µl N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) hozzáadásával indítottuk el. A tömörítő gél 0,25 ml „A”, 0,5 ml „C” oldatot és 1,75 ml desztillált vizet tartalmazott. Ez esetben a polimerizáció elindítása 12,5 µl 10 %-os APS és 6,25 µl TEMED hozzáadásával történt. A futtató puffer 21,7 g glicint, 4,5 g TRIS-t és 2,5 g DOC-ot tartalmazott 1000 ml desztillált vízben. A géleket a mintafelvétel előtt 15 mA/gél áramerősséggel 10 percig előfuttattuk. Ezt követően ugyanezen az áramerősségen 80-90 perc alatt választottuk el a mintákat.

A minták előhívása alciánkék-ezüst festéssel történt. A géleket egy éjszakán keresztül 0.005 %-os alciánkék oldatban áztattuk (25 mg alciánkék/ 500 ml 40 %-os etanol, 5 %-os ecetsav oldat), majd hatszor öt perces desztillált vizes mosást végeztünk. Ezután 0,1 %-os

AgNO<sub>3</sub> oldattal 25 percig festettük a géleket. Rövid desztillált vizes, majd 0,3 % NaCO<sub>3</sub> oldattal történő mosás következett. A mintázat előhívását formaldehidet tartalmazó 3 % NaCO<sub>3</sub> oldattal végeztük (500 µl 32 %-os formaldehid/1000 ml) (Kiss *et al.*, 2001).

A géleket UVP BioDoc-It System készülékkel fotóztuk le.

#### **5.24. Bioinformatikai eszközök**

A DNS és fehérje szekvenciák alapvető kezelését (szekvenálási eredmények illesztése, restriktációs hasítóhelyek keresése, virtuális klónozás, primertervezés) a LaserGene programcsomaggal végeztük (DNAS<sub>t</sub>ar Inc. <http://www.dnastar.com>). A gének / nyitott leolvasási keretek prediktálását a GenMark (<http://exon.biology.gatech.edu>) és az ORF Finder ([http://www.bioinformatics.org/sms/orf\\_find.html](http://www.bioinformatics.org/sms/orf_find.html)) programokkal végeztük.

Homológok keresésére egyrészt az NCBI honlapon elérhető BLAST programot (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), másrészt a HHpred szervert használtuk, a HHsearch 1.6.0.0 algoritmussal, az összes HMM adatbázissal szemben, alap beállításokat alkalmazva (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>).

A funkcionális doménekről a PROSITE (1990; [www.expasy.org/prosite](http://www.expasy.org/prosite)) és Pfam ([www.sanger.ac.uk/Software/Pfam](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam)) adatbázisokból gyűjtöttünk információkat.

## 6. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

### 6.1. Spontán receptorhibás baktériumok és *host range* fágmutánsok izolálása

Első célunk olyan baktérium mutánsok izolálása volt, amelyek felszínén módosult szerkezetű fágreceptor van jelen. Ebben az eljárásban nem egyszerűen a fágra rezisztens mutánsokat kerestünk, hanem olyanokat, amelyeken *host range* fágmutánsokat is lehet izolálni. Ez a fenotípus azt jelenti, hogy a baktérium mutáns felszínén a fágreceptor módosult formában van jelen, és a fágpopulációban előforduló spontán mutánsok között találhatók olyan fágreszecskek, amelyek képesek felismerni ezt a módosult receptort. Mivel több kísérleti eredmény alapján feltételezhető volt, hogy a K<sub>R</sub>5 antigén szolgál receptorként a 16-3 fág számára, az így izolált baktérium mutánsok vagy a K<sub>R</sub>5 antigén szerkezeti módosulatait termelik, vagy annak hiányában egy másik, eddig még ismeretlen sejfelszíni struktúra szolgál receptorként a *host range* fágok számára. Ez a rendszer alkalmas a baktérium-fág fertőzés mechanizmusának vizsgálatára azáltal, hogy mindkét partner oldaláról (a receptor hibás baktérium mutánsok, valamint a *host range* fágmutánsok) lehetőségünk van a folyamatban részt vevő gének/fehérjék azonosítására. Másrészt, az így izolált baktérium mutánsok, csoportunk másik kutatási irányához hozzájárulva, kiindulási alapul szolgálhatnak a K<sub>R</sub>5 antigén szerkezetét meghatározó új gének azonosítására, valamint lehetőséget nyújthatnak a K<sub>R</sub>5 szerkezete és a baktérium-növény szimbiózis összefüggéseinek tisztázására.

Csoportunk több, mint száz spontán fágerezisztens baktérium mutánst izolált (a baktérium mutánsok izolálása Putnoky Péter és Hoffmann Gyula munkája). Ezeket tovább tesztelve, három olyan törzset találtunk, melyek pázsitján *host range* fágok plakkjai megjelentek, ezek a GH4046, GH4180 és PP4073 törzsneveket kapták.

A *host range* fágok izolálásakor három függetlenül növesztett 16-3 vad típusú fágpopuláció magas titerű ( $10^{10}$  pfu/ml) keverékéből indultunk ki. Ennek 0,1 ml-ében lemezenként néhány tucat *host range* plakkot kaptunk. Az izolálások során felfigyeltünk egy érdekes jelenségre, mely a későbbiek során kulcsfontosságúnak bizonyult a fágmutánsok molekuláris elemzésekor. Ez pedig az volt, hogy azonos időben, ugyanazt a vad típusú fágpopulációt, azonos technikával alkalmazva, a GH4180 és a PP4073 baktériumok pázsitjain körülbelül négyszer annyi *host range* plakk jelent meg, mint a GH4046 törzs esetében. Ez arra utalt, hogy az egyes baktérium törzsek különféle típusú (legalább kettő) fágmutáns izolálását teszi lehetővé. Többféle mutáns allél jellemzése révén a receptor - bakteriofág kölcsönhatás pontosabban jellemezhető, ezért az egyes baktérium törzsek esetében több független plakkból



szaporítottunk fel *host range* fágtörzseket, ezeket teszteltük gazdaspecifitás tekintetében az összes baktérium mutáns, majd a különböző izolátumok reprezentánsait kiválasztottuk további vizsgálatok céljából. A baktérium mutánsokat és a segítségükkel izolált *host range* fágmutánsokat, valamint a fágmutánsok viselkedését a gazdaspecifitási tesztekben a 6. táblázat foglalja össze.

Baktérium törzsek	Fágtörzsek és szaporodási képességük					
	16-3 (wt)	<i>h5</i>	<i>h105</i>	<i>h842</i> <sup>ts</sup>	<i>h109</i> <sup>ts</sup>	<i>h843</i> <sup>ts</sup>
Rm41 (wt)	++	++	++	++	++	++
GH4046	–	+	+	++	–	–
GH4180	+	++	++ <sup>*</sup>	++	++ <sup>*</sup>	++
PP4073	–	+	+	++ <sup>*</sup>	+	+ <sup>*</sup>

**6. táblázat: Munkánk során izolált spontán receptor hibás *S. meliloti* törzsek (GH4046, GH4180, PP4073) és 16-3 *host range* fágtörzsek (*h5*, *h105*, *h842*, *h109*, *h843*).**

Rm41 (wt) – *S. meliloti* vad típus

16-3 (wt) – 16-3 vad típus

(ts) – hőmérséklet-érzékeny mutáns (bővebben lsd. a szövegben)

(\*) – az egyes *host range* fágoakat a \*-gal jelölt baktérium törzsön izoláltuk

(–) – az adott baktérium törzsön nem szaporodik

(+) – kicsi, zavaros plakkokat képez

(++) – nagy, határozott plakkok, konfluens lízis

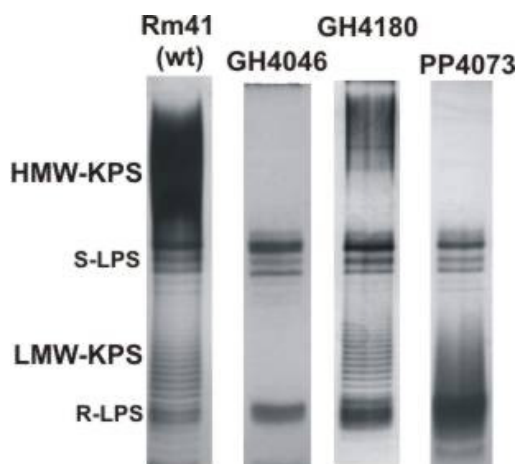
A gazdaspecifitás tekintetében a *host range* fágok eltérő fenotípust mutattak. A legszembetűnőbb különbség, hogy míg a *h5*, *h105* és a *h842* fágok minden tesztelt baktérium törzset képesek fertőzni (bár eltérő mértékben), addig a *h109* és a *h843* mutánsok nem szaporodnak a GH4046 baktériumokon. Amint azt az izolálások alkalmával a megjelenő *host range* plakkok számából sejteni lehetett, a GH4180 és a PP4073 baktérium törzseken izolálhatók olyan gazdaspecifitású *host range* fágok, mint a GH4046 törzsön (*h105*, *h842* és *h5*), valamint ezen a két törzsön megjelenik egy másik gazdaspecifitású csoport is (*h109*, *h843*), melyeknek nem gazdája a GH4046 mutáns.

Az izolált fágmutánsok egy része hőmérséklet-érzékenynek bizonyult (6. táblázat ts – *temperature sensitive*), ami azt jelenti, hogy 37°C-on (a permisszív 28°C-al ellentétben) tűszúrásnyi, szemmel alig észrevehető plakkokat képez. Ezt a fenotípust a későbbi munkákban nagyon jól ki tudtuk használni.

A három baktérium mutáns eltérő fenotípusa a fágtesztekben szintén azt sugallta, hogy három különféle baktérium mutációt sikerült izolálnunk.

## 6.2. A fágreceptor mutáns baktériumok sérültek a K<sub>R</sub>5 antigén termelésben

A három baktérium mutáns jellemzésekor abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a K<sub>R</sub>5 antigén szerepet játszik a 16-3 fertőzésben, tehát az várható, hogy az izolált mutánsok hibásak a K<sub>R</sub>5 antigén termelésben. A kapszuláris (és a lipo-) poliszacharidok vizsgálatára kidolgozott viszonylag egyszerű eljárással, forró fenolos extrakcióval az egyes törzsekből poliszacharid preparátumot készítettünk, majd poliakrilamid gélelektroforézist követően a gélben szétvált komponenseket alciánkék-ezüst festéssel tettük láthatóvá (19. ábra). A vad típusú törzs (Rm41) magas (HMW-KPS) és alacsony (LMW-KPS) molekula tömegű kapszuláris poliszacharid mintázatához viszonyítva, a mutánsok mindegyike sérült a KPS termelésben, és az egyes mutánsok mintázata egymástól is különbözött. Ezért következő lépésként azt próbáltuk kideríteni, hogy a három baktérium törzs mely gének (már ismert vagy eddig még nem azonosított *rkp* gének) mutáns alléljait hordozza.



**19. ábra: DOC-PAGE gélkép az egyes baktérium mutánsok KPS (és LPS) mintázatáról**

Rm41 (wt): vad típusú mintázat. GH4046, GH4180 és PP4073 mutánsok által termelt poliszacharid mintázat. HMW-KPS: magas molekulatömegű kapszuláris poliszacharid, LMW-KPS: alacsony molekulatömegű kapszuláris poliszacharid, S-LPS: „smooth” lipopoliszacharid, R-LPS: „rough” lipopoliszacharid. A KPS és LPS poliszacharidokat eltérő festődésük alapján lehetett megkülönböztetni az eredeti gélen (barna festődés: LPS, szürke festődés: KPS).

### 6.3. A receptormutációk az *rkpM*, *rkpZ* és *rkpY* géneket érintik

Annak meghatározására, hogy az izolált GH4046, GH4180 és PP4073 törzsekben mely géneket érintenek a mutációk, különböző genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk. A mutánsok által termelt poliszacharidok DOC-PAGE mintázata alapján céltudatosan terveztük meg a kísérleteket, ugyanis csoportunk korábbi eredményei szerint az egyes mintázatok mindegyike hozzárendelhető volt korábban leírt *rkp* génekhez/géncsoportokhoz. Ezért először annak megállapítására törekedtünk, hogy a mutánsokban a már ismert *rkp* gének valamelyike sérült-e. Ehhez elsőként az egyes *rkp* régiókat lefedő kozmid klónokkal végeztük el a komplementációs kísérleteket (7. táblázat, 20. ábra). A komplementáció meglétét a 16-3 fágfertőzés visszaállásával (R-rezisztens → S-szenzitív) teszteltük. A komplementációs kísérletek eredményeit a 7. táblázat mutatja be.

Bejuttatott régiók	Transzkonjugáns fenotípus (érzékenység 16-3 vad típusú fággal szemben)		
	GH4046	GH4180	PP4073
–	R	R	R
pPP428 ( <i>rkp-1</i> régió)	R	R	R
pAT330 ( <i>rkp-2</i> régió)	R	R	R
pAT399 ( <i>rkp-3</i> régió bal oldala)	S	R	R
pAT401 ( <i>rkp-3</i> régió jobb oldala)	R	S	S
pMW23 ( <i>rkpZ</i> gén)	–	S	–
pEN3265 ( <i>rkpY</i> gén)	–	–	S
pAT399 <i>orf140</i> ::Tn5 (174)	S	–	–
pAT399 <i>rkpL</i> ::Tn5 (187)	S	–	–
pAT399 <i>rkpM</i> ::Tn5 (212)	<b>R</b>	–	–
pAT399 <i>rkpN</i> ::Tn5 (107)	S	–	–
pAT399 <i>rkpO</i> ::Tn5 (168)	S	–	–
pAT399 <i>rkpP</i> ::Tn5 (105)	S	–	–
pAT399 <i>rkpQ</i> ::Tn5 (124)	S	–	–

#### 7. táblázat: A komplementációs kísérletek eredményeinek bemutatása

S – 16-3 fagra szenzitív

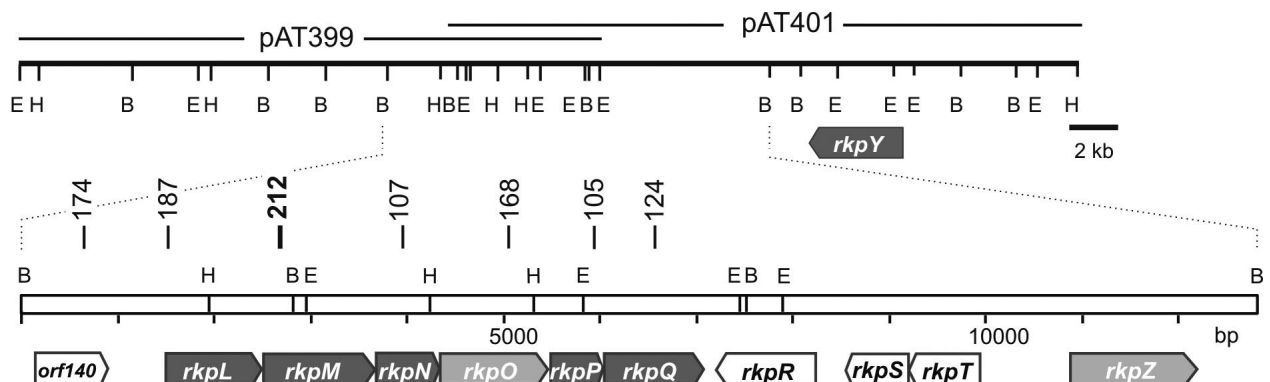
R – 16-3 fagra rezisztens

(–) – a kísérletet nem végeztük el

A GH4180 törzs DOC-PAGE alapján mutatott poliszacharid termelése a korábbi eredmények alapján az *rkpZ* mutánsokéhoz hasonlított. Az *rkpZ* gén az *rpk-3* régió jobb oldali szakaszán helyezkedik el (20. ábra), ezért miután ezt a régiót lefedő kozmid klónnal pozitív eredményt kaptunk, a következő lépésben célzottan csak az *rkpZ* gént tartalmazó plazmidszármazékkal is elvégeztük a kísérletet, ezzel bizonyítottuk, hogy a GH4180 törzs az *rkpZ* mutáns allélját tartalmazza.

A PP4073 törzs esetében ugyanezt a logikát követve igazoltuk, hogy ebben a törzsben az *rkpY* gént érinti a mutáció.

A GH4046 törzsben a DOC-PAGE elemzés szerint teljesen megszűnt a kapszuláris poliszacharid termelés. Az első komplementációs kísérletekben a keresett mutációt az *rpk-3* régió bal oldali szakaszára lokalizáltuk. Ez a szakasz hét gént fed le (20. ábra), melyek mutáns alléljainak DOC-PAGE mintázataról csak hiányos adatok álltak rendelkezésre. Ezért további komplementációs kísérleteket végeztünk, ahol olyan kozmid klónokat juttattunk be a GH4046 törzsbe, melyek egy-egy érintett génben (*orf140*, *rkpL*, *rkpM*, *rkpN*, *rkpO*, *rkpP*, *rkpQ*) ismert pozíciójú Tn5 transzpozon inszerciót hordoztak (7. táblázat, 20. ábra) (Kiss *et al.*, 2001).



**20. ábra: Az *rpk-3* régió szerkezete** (Kiss *et al.*, 2001)

A pAT399 és a pAT401 kozmid klónokban található inszertek által lefedett részek az ábra felső részén láthatók. Az ábra alsó részén a függőleges vonalak a Tn5 transzpozonok beépülési helyeit mutatják. Nyilakkal jelölve az azonosított gének helye és irányultsága látható; fehér nyilak: szerepük a KPS szintézisben és a 16-3 fágfertőzésben nem bizonyított; szürke nyilak: a KPS termelésben és a 16-3 fágfertőzésben is szerepet játszanak (sötét szürke: az inszerciós allélek teljes fágrezisztenciát okoznak, világos szürke: inszerciós mutációik részleges fágrezisztenciát okoznak).

A komplementáció hiányát vagy megtörténtét ismét fágteszt segítségével állapítottuk meg. A kísérlet kiértékelése azon alapult, hogy ha a bejuttatott kozmid klónban a transzpozon nem ugyanazt a gént érinti, mint a GH4046 törzsben lévő mutáció, akkor minden bioszintézis gén legalább egy hibátlan kópiája jelen van a sejtben. Ennek eredményeként a vad típusú fágreceptor megjelenik a felszínen, s ezt a 16-3 vad típusú fág képes felismerni (S-szenzitív). Abban az esetben viszont, ha a Tn5 mutációt az a gén tartalmazza a kozmid klónban, amely a GH4046 törzsben is sérült, akkor a gén vad típusú allélja hiányában nem történik komplementáció. Ebben az esetben a 16-3 fág továbbra sem képes felismerni a bakteriális sejtfelszínt, a fágfertőzési tesztben tarfolt nem keletkezik (R-rezisztens). Eredményeink szerint csak a pAT399::*rkpM*::Tn5(212) klón nem tudta helyreállítani a vad fenotípust (7. táblázat, 20. ábra). Ez azt jelentette, hogy a keresett mutáció az *rkpM* génben van, tehát a GH4046 baktériumtörzs az *rkpM* egy mutáns allélját hordozza.

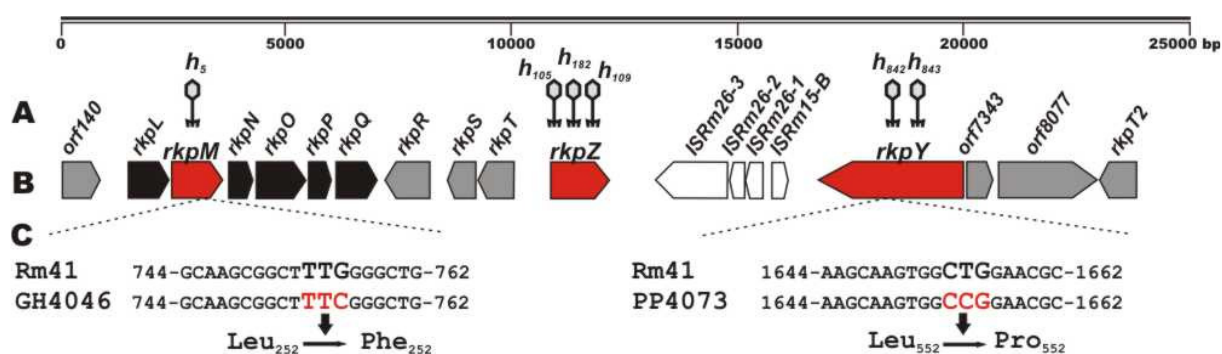
#### 6.4. A fágreceptor kialakításában részt vesz az RkpM és az RkpY fehérje

Az a tény, hogy a GH4046 mutáns törzs egyáltalán nem termel kapszuláris poliszacharidot, arra utalt, hogy kezdeti feltételezésünkkel ellentétben a 16-3 fág receptora valószínűleg nem, vagy nem kizárólag a K<sub>R</sub>5 antigén. Felvetődött a kérdés, hogy a *host range* fágmutánsok esetében az „elsődleges” receptorként szolgáló K<sub>R</sub>5 antigén hiányában egy másik sejtfelszíni poliszacharid veheti át annak szerepét. Ha ez igaz, akkor minden *rkp* mutáns, de legalább az *rkpM*::Tn5(212) mutációt hordozó baktériumon lehetséges volna *host range* fágmutánsok izolálása. Ezt több független kísérletben is megpróbáltuk, de minden alkalommal csak a kontrollként alkalmazott GH4046 törzsön kaptunk *host range* plakkokat. Hasonlóképpen, az *rkpY* több mutáns allélját alkalmazva sem tudtunk *host range* fágokat izolálni.

Tehát közvetett bizonyíték mutatott arra, hogy a fágreceptor nem, vagy nem kizárólag a K<sub>R</sub>5 antigén és hogy az *rkpM*<sub>4046</sub> valamint az *rkpY*<sub>4073</sub> allélek speciális mutációt hordoznak, melyek egy megváltozott szerkezetű fágreceptort eredményeznek. Kézenfekvő volt ezek után a feltételezés, hogy a 16-3 fág receptora fehérje természetű lehet, és maga az RkpM és az RkpY fehérje részt vesz annak kialakításában. Az *rkpM*<sub>4046</sub> és az *rkpY*<sub>4073</sub> allélek speciálisak a fágfertőzés szempontjából, ezért valószínűleg csak egyetlen aminosavcserét eredményező mutációt tartalmaznak.

A következőkben az *rkpM*<sub>4046</sub> és az *rkpY*<sub>4073</sub> allélek egyedi fenotípusa miatt a mutációk szekvencia szintű meghatározását tűztük ki célul. Mindkét allél esetében egy missense mutációt azonosítottunk. A vad típusú *rkpM* allél leucint (Leu<sub>252</sub>) meghatározó kodonjának

(TTG) egyik bázisa változott (TTC) meg a GH4046 törzsben, mely leucin helyett fenilalanin (Phe<sub>252</sub>) beépülést okoz az aminosavlánc C-terminális részén (az *rkpM* gén 1161 bp hosszúságú, az általa kódolt feltételezett fehérje 387 aminosavból áll). A PP4073 törzs 1024 aminosav hosszúságú RkpY fehérjének 552. aminosava leucinról (Leu<sub>552</sub>) prolinra (Pro<sub>552</sub>) változott, ami DNS szinten a CTG kodon CCG-re történő cseréjét jelenti (21. ábra) (a mutáns allélek DNS szekvencia meghatározásának pontos leírása megtalálható Pálvolgyi Adrienn doktori disszertációjában, valamint a (Putnoky *et al.*, 2004) és a (Palvolgyi *et al.*, 2009) hivatkozásokban).



**21. ábra: Fágreceptor mutációk a *S. meliloti* baktérium *rkp3* régiójában**

**A:** A receptor hibás baktériumokon izolált 16-3 fágmutánsok. **B:** A teljes *rkp3* régió azonosított génjei ((Palvolgyi *et al.*, 2009) alapján); szürke nyíl: olyan géneket jelöl, melyek funkciója még ismeretlen; fekete nyíl: a KPS szintézisében fontos gének; piros nyíl: a KPS bioszintézisében és a fágfertőzésben is szerepet játszó gének **C:** Az adott génekben izolált missense fágreceptor mutációk DNS szekvencia és aminosav szinten.

A *rkpZ*<sub>4180</sub> allél ellenben nem tűnt különlegesnek, ugyanis az *rkpZ* Tn5 inszerciós allélja segítségével is tudtunk host range fágot izolálni (*hI82*); ennek elemzését a továbbiakban bevontuk a munkánkba. Ez az eredmény arra utalt, hogy az RkpZ fehérje közvetlenül nem vesz részt a fágreceptor kialakításában, de hiánya (illetve annak következménye) közvetetten befolyásolja a fágfertőzést. Az *rkpZ* mutánsok eddig ismert fenotípusa az, hogy a vad típusú kapszuláris poliszacharidhoz képest nagyobb lánchosszúságú polimert termelnek (Reuhs *et al.*, 1995). Ennek fényében a K<sub>R</sub>5 antigén szerepe továbbra is feltételezhető a 16-3 fágfertőzésben (a továbbiakban erre a kérdésre még visszatérünk).

## 6.5. A *host range* fágmutások jellemzése

A *16-3* bakteriofág genom meghatározott részeinek DNS szekvenciáját egy-egy régió analízise során az 1980-as évektől magyar kutatók (Dr. Orosz László, Dr. Papp Péter és Dr. Putnoky Péter kutatócsoportja) munkájának eredményeképpen folyamatosan ismerhettük meg. Mára a *16-3* fággenom teljes, 60195 bp hosszúságú DNS-szekvenciája elérhető a nukleotid adatbázisokban (AC: DQ500118). A dolgozatban bemutatott munka megkezdésekor a DNS-szekvencia adatok még hiányosak voltak, ezért csoportunk elvégezte a kezdeti kísérletekhez szükséges *h* régió (13619-15913 közötti szakasz) DNS-szekvencia meghatározását (Putnoky *et al.*, 2004). A további kísérletek tervezésekor, Dr. Papp Péter személyes közlésének köszönhetően, már rendelkezésünkre állt a teljes genomszekvencia.

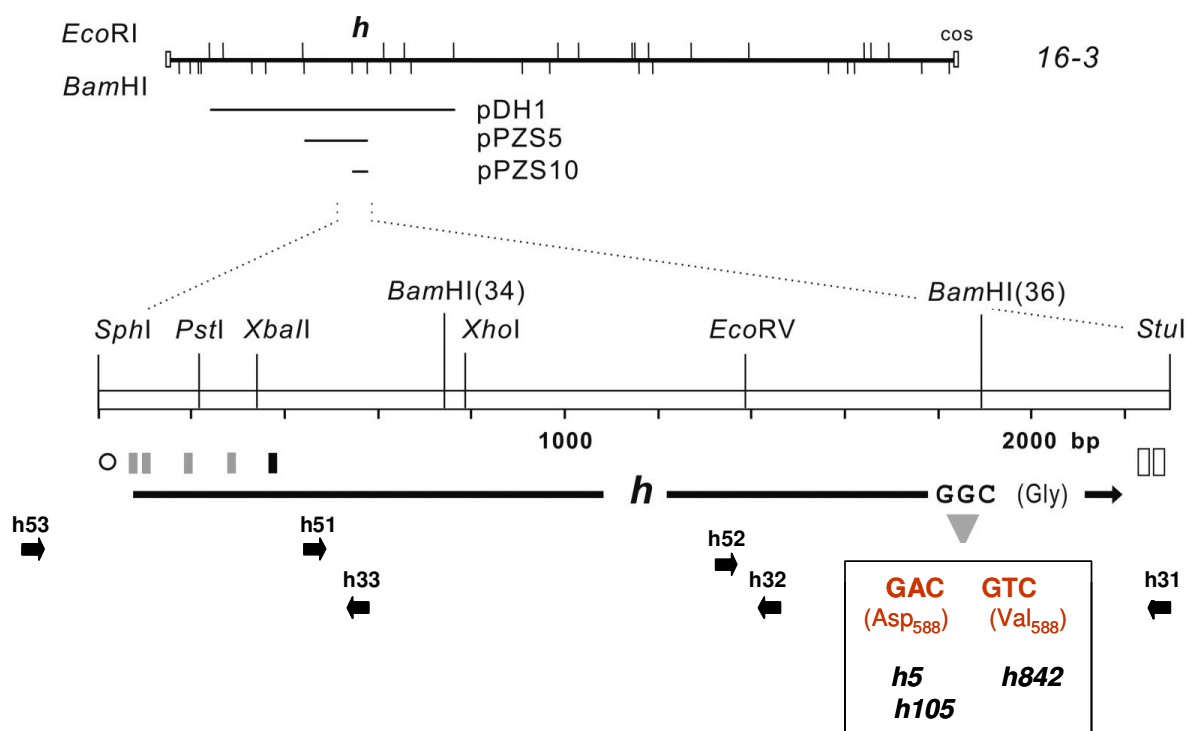
### 6.5.1. A *h5*, *h105*, *h842* *host range* mutációk azonosítása: a *hI* gén részt vesz a baktériumfelszín felismerésében

Orosz László csoportjában Palágyi Zsuzsanna határozta meg egy *host range* (*h6*) fenotípusért felelős gén körülbelüli helyzetét *marker rescue* technikával, mely során *h* mutáns fágból épített be DNS fragmenteket egy plazmidba. Ha a plazmidot tartalmazó baktériumon vad típusú fágokat szaporítottak el, akkor homológ rekombináció révén a fágokban megjelenhet a *h* mutáció. A *h* mutások nagy száma jelezte, hogy a kérdéses mutáció a klónozott DNS szakaszon helyezkedik el. Egyre kisebb DNS fragmentumokkal dolgozva, a pPZS5 klón [*Bam*HI(29)-*Bam*HI(36) fragment], illetve az 1,16 kb-os pPZS10 klón [*Bam*HI(34)-*Bam*HI(36) fragment] tartalmazta a mutációt (22. ábra). Az érintett gén bázissorrendjét, illetve a mutáció természetét nem határozták meg, ezért elhatároztuk, hogy a *h* gén szerkezetét és a *host range* mutációk természetét is megvizsgáljuk.

A *Bam*HI(34)-*Bam*HI(36) fragment DNS szekvenciáját átfedő szubklónok segítségével határozták meg csoportunkban (Putnoky Péter és Békási Krisztina munkája). A *Bam*HI(34)-*Bam*HI(36) fragment nukleotid-szekvenciáját elemezve egyetlen olyan leolvasási keretet találtunk, amelyről feltételezni lehetett, hogy a H fehérjét kódolja. Azonban sem a feltételezett gén eleje, sem a vége nem volt rajta ezen a fragmenten, ezért további szubklónok segítségével mindkét irányban tovább folytattuk a szekvencia meghatározását. Végül a feltételezett *h* gént egy *Sph*I-*Stu*I fragmenten tudtuk lokalizálni (22. ábra).

A gén 3' végénél azonosítottunk egy transzkripció-terminációs szignálra hasonlító szekvenciát (AGCCCGCCCTCGCGGGCT), amelynek jelenléte megerősítette, hogy az azonosított ORF egy valós gént takar. A gén kódoló részének kezdőpontját azonban nem tudtuk egyértelműen azonosítani. Az 5' végen, a nyitott leolvasási keret elejét jelző ATG előtt

több mint 300 bp kódoló kapacitás található az ugyanabban a leolvasási keretben lévő TGA translációs stop kodontól számítva. Elképzelhető ezért, hogy a kódoló régió — nem szokványos módon — jóval az első ATG előtt kezdődik. Transzlációs kezdetként az itt található *in frame* GTG, de a TTG vagy CTG kodonok is szóba jöhetnek. A 16-3 fág eddig megismert génjei esetében két ATG-től eltérő iniciátor kodon létét bizonyították a géntermék N-terminális aminosavainak meghatározásával. Az *int* gén GTG (Semsey *et al.*, 1999) míg az *immX* régió egyik kódoló szekvenciája CTG kodonnal kezdődik (Csiszovszki *et al.*, 2003). A feltételezett H fehérje szekvenciájának meghatározásához a GenMark génkereső program által is javasolt első *in frame* TTG kodont használtuk, ezt megelőzi egy GGAG motívum, ami riboszóma kötőhelyként szolgálhat. Az ORF így 2112 bp, az általa kódolt feltételezett fehérje pedig 704 aminosav hosszúságú (1. melléklet).



## 22. ábra: A 16-3 fág *h* génjének azonosítása és a *h5*, *h105*, *h842* mutációk jellemzése

Az ábra felső részén a 16-3 fág genomjának fizikai térképe (*EcoRI* és *BamHI*) látható. A *h* egy korábban meghatározott (*h6*) *host range* mutáció körülbelüli helyzetét, míg a vízszintes vonalak a megfelelő klónozott szakaszok hosszát jelzik.

Az alsó részen a *h* gén fizikai térképe, a *h5*, *h105* és *h842* mutációk helyzete és természete látható. A kör a *h* gén előtti *in frame* stop kodont, a szürke téglalapok lehetséges GTG, TTG és CTG start kodonokat, a fekete téglalap az első ATG start kodont, a fehér téglalapok a transzkripció-terminációs szignál helyét jelzik. A kis fekete nyilak a mutáns allélek felszorzozásához és DNS szekvencia meghatározásához használt primerek elhelyezkedését mutatják.



Miután a teljes feltételezett *h* gén bázissorendje rendelkezésre állt, azt vizsgáltuk, hogy a *h* génen belül megtalálhatók-e az általunk izolált *host range* mutációk, illetve mi azoknak a pontos helyzete és jellege. Először a két eltérő gazdaspecifitású csoportból 1-1 mutánst választottunk ki (*h5* és *h109*) analízisre. Mindkét törzsből DNS preparátumot készítettünk, majd PCR reakcióval felszaporítottuk a *h* régiót két erre a célra tervezett oligonukleotid primer segítségével (*h53* és *h31*, 22. ábra). A tisztított PCR fragmentek nukleotidszekvenciáját ezekkel és négy további primert használva határoztuk meg (22. ábra).

A *h5* mutáns esetében egy missense mutációt találtunk a feltételezett H fehérjét kódoló régióban. A vad típusú fág GGC, azaz glicint kódoló triplete a mutánsban GAC kodonra változott, ami aszparaginsavat határoz meg a 704 aminosav hosszúságú fehérje 588. pozíciójában (22. ábra, 1. melléklet).

A *h109* mutáns elemzésekor a *h* génben nem találtunk mutációt, így azt kellett feltételeznünk, hogy a változás ebben az esetben más gént (fehérjét) érint. Ezek szerint elképzelhető, hogy a fág több fehérjéje is részt vesz a fágreceptor felismerésében. Ezért az előzőekben ismertetett *h* lókuszra a továbbiakban *hI* néven hivatkozunk, a *h5* mutáns allélját pedig *hI.5* jelöléssel illetjük.

A fenti eredmények fényében a *h5* mutánssal hasonló gazdaspecifitást mutató *h105* és *h842* törzsek *hI* alléljait a fentiekkel azonos módon és eszközökkel jellemeztük. A *h5*-höz hasonlóan mindkét mutánsban egy-egy missense mutációt találtunk a *hI* génben, ezek pozíciója pontosan megegyezett a *hI.5* allél esetében tapasztalttal. Érdekes módon a *h105* mutánsban ugyanaz a bázis változott, és ezáltal ugyanazt az aminosavcserét okozza, mint amit a *hI.5* allélnál találtunk (Gly588Asp). Ugyanakkor, a *h842* mutánsnál szintén ugyanaz a triplet volt érintett, mint a fenti két esetben, de itt a vad GGC kodon GTC-re változott, ami glicinről valinra történő cserét okoz (Gly588Val) (22. ábra). Elképzelhető, hogy a *h842* mutáns több gazdán mutatott hatékonyabb szaporodóképessége (a *h5* és *h105* törzsekhez viszonyítva) ebből a különbségből adódhat (lsd. 6.1. fejezet, 6. táblázat).

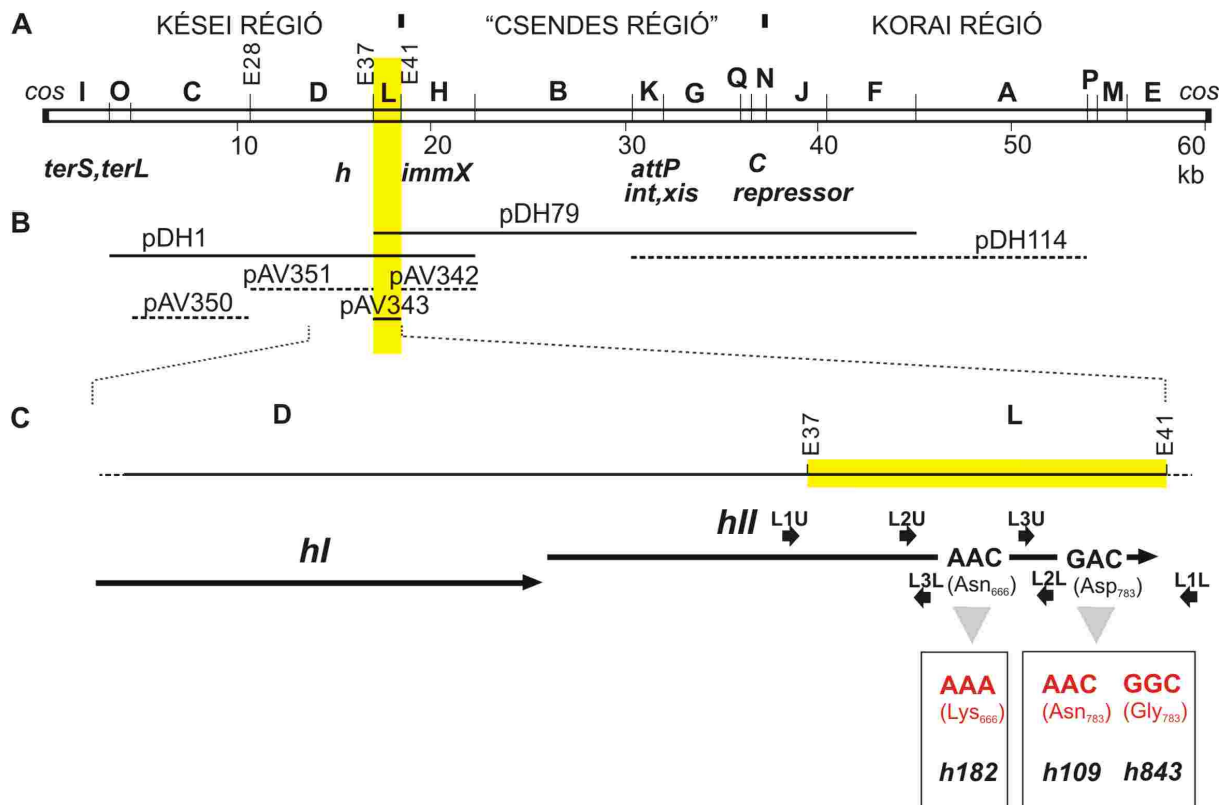
A fenti eredmények bizonyítják, hogy a feltételezett *hI* gén által kódolt fehérje szerepet játszik a fágreceptor felismerésében. Az aminosavcsere helye arra utal, hogy a kódolt fehérje C-terminális része fontos szerepet tölt be ebben a folyamatban.

### 6.5.2. A *h109*, *h843* és a *h182* *host range* mutációk azonosítása: a *hII* gén részt vesz a baktériumfelszín felismerésében

Amint az az előző pontból kiderült, a *h109* mutáns elemzésekor a *hI* génben nem találtunk mutációt, így azt kellett feltételeznünk, hogy a változás ebben az esetben más gént (fehérjét) érint. Mivel semmilyen támpontunk nem volt a mutáció helyét illetően, ún. *marker rescue* technikával próbáltuk minél szűkebb szakaszra behatárolni azt. A kísérletek kivitelezésénél kihasználtuk a mutáció hőmérséklet-érzékeny jellegét, azaz, hogy a *h109* fág 28°C-on határozott, 37°C-on viszont túsűrűsnyi, szemmel alig észrevehető plakkokat képez. A vad típusú fág plakkképzése 37°C-on is normális. Tehát magas hőmérsékleten (37°C) a nagyszámú *h109* mutáns populációban észrevehetőek a nagyságrendekkel kisebb számban előforduló, nagy plakkot adó vad fágok. A *marker rescue* kísérletekben a hőmérséklet-érzékeny *host range* fágokat olyan *S. meliloti* 41 transzkonjugáns baktériumokon növesztettük egy lépéses ciklusban, melyek a vad típusú *16-3* kromoszóma egy-egy meghatározott szakaszát plazmid/kozmid származék formájában tartalmzták (23. ábra). Az utódpopulációt Rm41 baktérium pázsiton titrálva, 28°C és 37°C-on történő párhuzamos inkubálást követően határoztuk meg a vad típusú fágreszecskek arányát. Vad típusú fágreszecskek létrejöhetnek spontán módon, valamint homológ rekombináció útján. Ez utóbbi esemény csakis akkor következhet be, ha a baktérium gazda a *h109* mutáció helyét lefedő vad típusú DNS fragmentet tartalmazza. A spontán reverziós rátát *16-3* fág-DNS-t nem tartalmazó vektor alkalmazásával állapítottuk meg. A spontán reverzióval létrejött fágreszecskek az utódpopulációban körülbelül  $10^{-5}$  nagyságrendben fordultak elő. Amennyiben vad típusú fágok ennél magasabb nagyságrendben ( $10^{-2}$  -  $10^{-3}$ ) képződtek, jelezte, hogy az adott kísérletben alkalmazott DNS fragment területére esik a keresett *h109* mutáció. A 37°C-on megjelenő *ts+* fenotípusú plakkok reprezentánsait gazdaspecifitás tekintetében is teszteltük. Amint az várható volt, a *ts+* revertánsok egyúttal vad (*h+*) gazdaspecifitást mutattak, igazolva, hogy a *h109* fágban a keresett *host range* mutáció egyben a hőmérséklet-érzékeny mutáció. A legkisebb szakasz, amely vad típusú rekombinánsok megjelenéséhez vezetett, az 1,5 kb nagyságú *EcoRI*(L) fragment volt (pAV343, 23. ábra).

Időközben az érintett régió teljes DNS szekvenálása befejeződött, és az adatok elemzése alapján látszott, hogy a teljes *EcoRI*(L) fragmenten keresztül egyetlen nyitott leolvasási keret húzódik, mely a *hI* géntől közvetlen *downstream* helyezkedik el, hosszúsága 2412 bp. Az új lókuszt *hII*-nek neveztük el. A szekvenciaadatok ismeretében (Papp Péter személyes közlés) PCR és szekvenálási primereket tervezhettünk a *h109* mutáció természetének pontos meghatározása céljából (23/C. ábra). Az L1U és L1L primer pár segítségével PCR reakcióban

felsőszoroztuk a *h109* fág-DNS *EcoRI*(L) fragmentjét, majd ezekkel és további 4 primer alkalmazásával meghatároztuk annak pontos bázissorrendjét. Egy báziscserét találtunk a vizsgált szakaszon (GAC triplet helyett AAC található a mutánsban), amelynek eredményeképpen aszparaginsav helyett aszparagin épül be a feltételezett 804 aminosav hosszúságú HII fehérje 783. pozíciójába (23. ábra, 1. melléklet).



**23. ábra: A *hII* host range lókuszt azonosítása**

**A:** A 16-3 fág *EcoRI* fizikai térképe a hasítóhelyekkel és a fragmentek egybetűs elnevezésével (Dorgai *et al.*, 1983), valamint az ismert génrégiók elhelyezkedése. **B:** A marker rescue kísérletekben alkalmazott kozmid/plazmid származékok által tartalmazott fragmentek; folytonos vonal: pozitív, szaggatott vonal: negatív marker rescue, sárgával kiemelve a pozitív marker rescue-t adó legkisebb, *EcoRI*(L) szakasz. **C:** a *hI* és *hII* lókusztok elhelyezkedése, a PCR és szekvenálási reakciókban alkalmazott primerek és a *hII* host range mutációi.

A továbbiakban a még azonosítatlan mutációkat hordozó *h843* valamint a *h182* törzsek elemzését végeztük. Ezek a fent részletezett *h109* mutánssal azonos gazdaspecifitást mutattak, ráadásul a *h843* mutáns ugyanazzal a hőmérséklet-érzékeny fenotípussal is rendelkezett, mint a *h109*. Így a fentiekkel azonos módon marker rescue kísérleteket végeztünk a *h843* fág mutációjának lokalizálása céljából. Ezek során szintén az *EcoRI*(L) volt az a legkisebb fragment, mely pozitív eredményt adott. A DNS szekvenálás eredménye alapján azt találtuk, hogy a *h843* mutánsban pontosan az a triplet volt érintett, mint a *h109*-ben, viszont más bázis

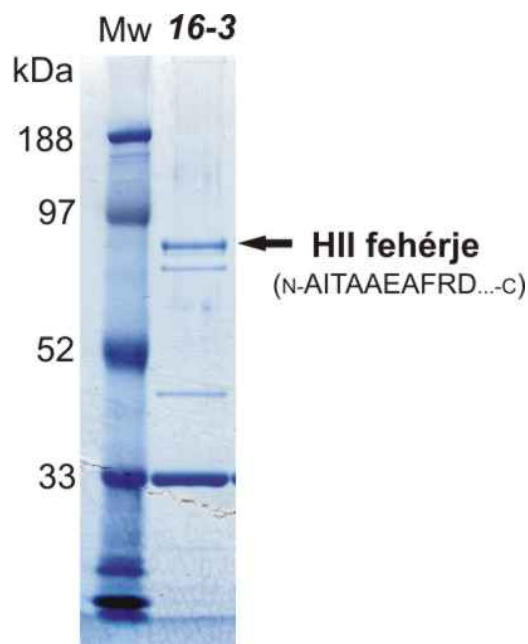
változott (a vad GAC helyett GGC), aszparaginsav helyett glicin beépülését okozva (23. ábra).

A *h182* mutáns esetében nem tudtunk a fentiekkel azonos módon *marker rescue* kísérleteket végezni (nem mutatott hőmérséklet-érzékenységet), viszont meghatároztuk az *EcoRI*(L) fragment bázissorrendjét, gyanítván, hogy itt is megtaláljuk a mutációt ezen a szakaszon. A *h109* és *h843* mutánsokkal ellentétben egy másik ponton találtunk bázis változást (a vad AAC helyett AAA). Ez a feltételezett HII fehérje 666. aminosavát érintő missense mutációt eredményez (aszparagin helyett lizin beépülést) (23. ábra).

## 6.6. A *hII* gén farki struktúrfehérjét kódol

A *host range* jelenséghez tehát két lókuszt tudtunk hozzárendelni a *16-3* fágban, ezeket *hI* és *hII* néven neveztük el. Mindkét gén feltételezett fehérjeterméke a szokványos fágfehérjékhez képest viszonylag nagy méretű: a HI 704, a HII pedig 803 aminosav hosszúságú. A *host range* mutációk jelenléte arra utal, hogy ez a két fehérje a baktériumfelszín felismerésében részt vevő disztális farokvég szerkezeti eleme.

Erdei és munkatársai korábban tanulmányozták a *16-3* fág struktúrfehérjeit (Erdei *et al.*, 1982). Különböző elválasztástechnikákat alkalmazva kimutatták, hogy a két legnagyobb, 85 és 72 kDa molekulatömegű fágfehérje a farok felépítésében vesz részt. Szerettük volna molekuláris szinten is bizonyítani a fehérjék azonosságát, ezért a vad típusú fágreszecskeket CsCl gradiens centrifugálással tisztítottuk, MOPS-SDS-PAGE technikával elválasztottuk, majd a gélben különvált fágfehérjéket PVDF (polivinil-difluorid) membránra elektroblottolással átvittük. A membránban lévő fehérjéket SimleBlue festéssel tettük láthatóvá, majd kooperációs munkában (Buzás Zsuzsanna, MBK Gödöllő) N-terminális aminosav szekvenálással sikerült igazolnunk, hogy a legnagyobb méretű, 85 kDa körüli fágfehérje megfelel a *hII* gén termékének (N terminálisának aminosav sorrendje: AITAAEAFRD...) (24. ábra, 1. melléklet). A HI fehérjét, mennyiségi korlátok miatt, ezzel a módszerrel nem tudtuk azonosítani.



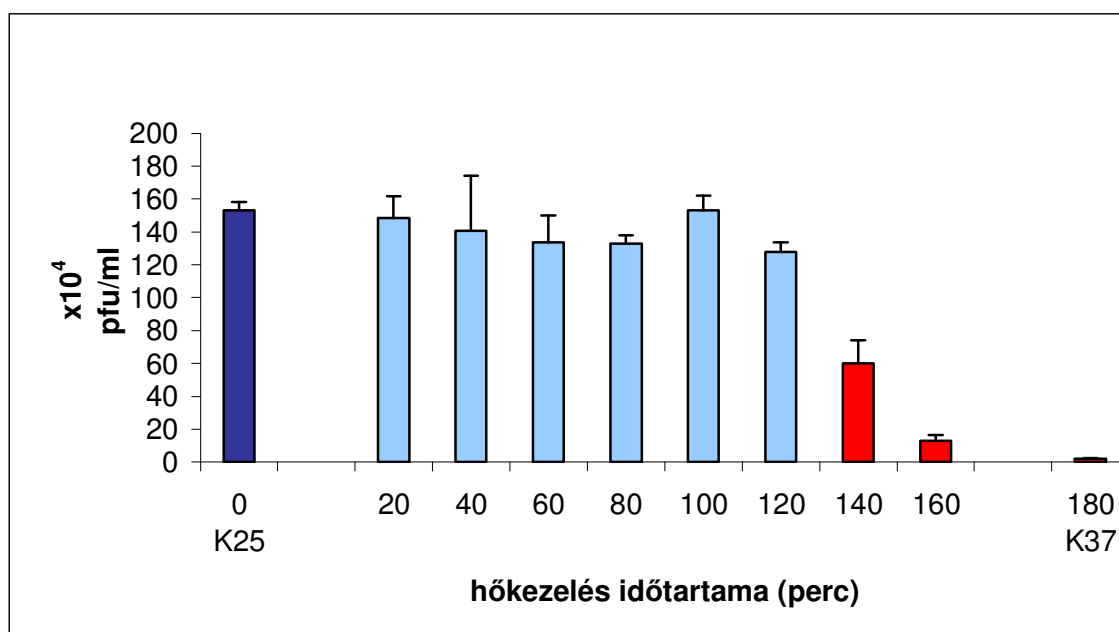
24. ábra: A HII fehérje azonosítása N-terminális aminosav szekvenálással

#### 6.7. A HII fehérje esszenciális a fágfejlődés késői szakaszában

A *hII* génben azonosított *h109* mutáció hőmérséklet-érzékeny jellegét kihasználva azt vizsgáltuk, hogy a magasabb hőmérséklet (37°C) a *h109* fág életciklusának mely szakaszában hat szaporodást gátló tényezőként, vagyis a HII fehérje (pontosabban annak a mutáció által érintett része) a fágciklus mely fázisában játszik fontos szerepet. Ehhez különböző időpontokban hőmérséklet eltolást alkalmazó (ún. *shift up/shift down*) kísérleteket végeztünk. Körülbelül  $2 \times 10^8$  baktériumhoz  $1 \times 10^5$  fágreszecske-t adtunk, és a fágok hozzáadásának pillanatától 180 percig növesztettük a kultúrákat, lehetőséget biztosítva egy teljes fágciklus lezajlásához (a fágreszecske-kirajzása a 135. perctől történik). Kontrollként a végig 25°C-on és a végig 37°C-on tartott lizátumokat alkalmaztuk (K25 és K37, 25. ábra). A 25°C-os kontroll lizátumok esetében kapott átlagosan  $1,5 \times 10^6$  titerrel szemben a 37°C-os lizátumoknál két nagyságrenddel kevesebb fágreszecske-t számoltunk (25. ábra).

Ismervén, hogy egy olyan *host range* mutációról van szó, mely egyúttal hőmérséklet-érzékeny, várható volt, hogy a *h109* mutáns adszorpciója gátolt magasabb hőmérsékleten, vagyis az első néhány percben alkalmazott hősokk alacsony fágspórolathoz vezet. Ezzel szemben azt tapasztaltuk, hogy amikor a fágokat és a baktériumokat 37°C-on előmelegítettük, és 37°C-on végeztük az adszorpciót (a fágok hozzáadásától számított első 10 perc), majd 25°C-on folytattuk a növesztést, az utópopuláció fág száma megegyezett a 25°C-os kontroll lizátum titerével.

További kísérletekben olyan kultúrákat indítottunk, melyeket a fág hozzáadásának pillanatától 37°C-on rázattunk különböző ideig (0, 20, 40...160, 180 percig, 25. ábra), majd a permisszív 25°C-on folytattuk a növesztést, összesen 180 percig, végül meghatároztuk a lizátumok titerét. Érdekes módon eredményeink azt mutatták, hogy az első 120 percben a magas hőmérséklet nem befolyásolja a fáglizátumok titerét. A 140 percig alkalmazott restriktív hőmérséklet pedig már körülbelül felére, míg a 160 perces hőkezelés 1/10-ére csökkentette a keletkezett fágreszecskek számát. Az eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy a HII fehérjének a *h109 ts* mutáció által érintett része a fágfejlődés késői szakaszában, feltehetően a fágreszecskek összeépülésében és/vagy a lízisben játszik fontos szerepet (ez utóbbi feltételezést további eredményeink kizárták, lsd. 6.9. fejezet: a *hII* inszerciós mutánsok képesek lizálni). Eredményeink arra is rámutattak, hogy az érett *h109* fágreszecskek már nem hőérzékenyek, vagyis a más komponensekkel komplexbe épült mutáns HII fehérje már rezisztens a magasabb hőmérsékletre.



**25. ábra: A *h109 ts* mutáció jellemzése**

K25: 25°C-on növesztett kontroll, K37: 37°C-on növesztett kontroll. A *h09* mutáns a fágciklus első két órájában nem érzékeny a magas hőmérsékletre, csak az ezt követő periódusban ható hősök csökkentik a fághozamot a kontroll (K25) lizátumhoz képest.

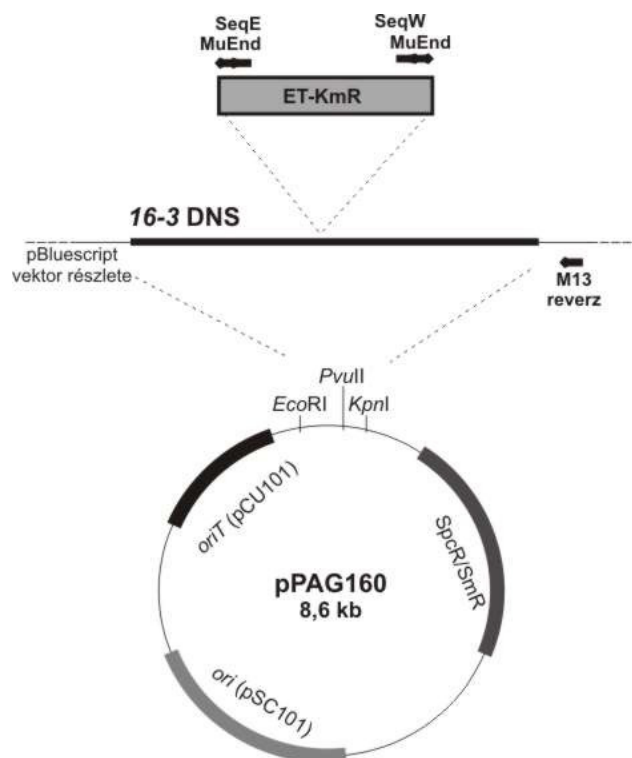
## 6.8. A 16-3 fág kései génrégiójának célzott mutagenézise

A 16-3 fág teljes genom szekvenálásának befejeztével (AC: DQ500118) lehetőség nyílt az azonosított két *host range* lókuszt környezetében elhelyezkedő gének előrejelzésére. A *hII* géntől *downstream* a már ismert *immX* régió helyezkedik el (Csiszovszki *et al.*, 2003), vagyis a *hI-hII* génekkel lezárul a fágészecske felépítéséért felelős kései génrégió. Mivel, ellentétben más génrégiókkal, nagyon kevés ismeretanyaggal rendelkezünk erről a területről, érdemesnek tűnt a fordított genetika eszközével vizsgálni ezt a genomszakaszt. Úgy gondoltuk, hogy a régió génjeinek feltérképezésével, funkcionális elemzésével nemcsak a 16-3 fágkutatáshoz, hanem a fágok evolúciójának megértéséhez is értékes adatokkal járulhatunk hozzá.

A *hI* és *hII* géneken kívül további öt, *upstream* elhelyezkedő feltételezett gént választottunk ki inszerciós mutagenéziss és további analízis céljából: *orf017*, *orf018*, *orf019*, *orf20*, *orf21* (28. ábra).

Az inszerciók létrehozásához a pDH1 kozmid klón felhasználásával szubklónoztuk a 16-3 DNS különböző fragmentjeit (a 4,3 kb hosszú *SalI-SalI* fragmentet, mely lefedi az *orf017*, *orf018*, *orf019* és az *orf020* egy részét, az *EcoRI*(D) és az *EcoRI*(L) fragmenteket) pBluescript II SK(+) klónozó vektorba (26. ábra). A transzpozíciós mutagenézist az Anyagok és Módszerek fejezetben (5.19. fejezet) leírtak alapján végeztük, *in vitro* Mu entranszpozon rendszer segítségével. A kanamicin rezisztenciát hordozó transzpozon (ET-Km<sup>R</sup>-3) véletlenszerűen épül be az adott plazmidba. Az inszerciók helyét először fizikai térképezéssel, valamint PCR reakciók segítségével (a transzpozonra tervezett MuEnd primer és a pBluescript vektorra specifikus primer felhasználásával) határoltuk be. A kiválasztott klónok esetében a beépülés pontos szekvenciahelyét a transzpozonra tervezett SeqE és SeqW primerek segítségével állapítottuk meg (26. ábra).

A különböző mutagenizált 16-3 DNS fragmenteket hordozó plazmidok (pBluescript származékok) nem juttathatók be konjugációval rhizobium baktériumba, ezért az inszerciós mutációkat tartalmazó szakaszokat pPAG160 konjugatív plazmidba építettük át (26. ábra). A mutagenizált plazmidokból megfelelő restriktációs enzimek segítségével kivágott fragmenteket vagy a pPAG160 vektor *EcoRI* klónozóhelyére építettük, vagy T4 polimeráz segítségével tompa végeket létrehozva (a *SalI-SalI* fragmentek esetében), a pPAG160 vektor *PvuII* helyére ligáltuk. A pPAG160 plazmid egy „helper” (pCU101) plazmid segítségével már átvihető rhizobiumba konjugációval.



## 26. ábra: Az *in vitro* transzpozíciós mutagenézis szemléltetése

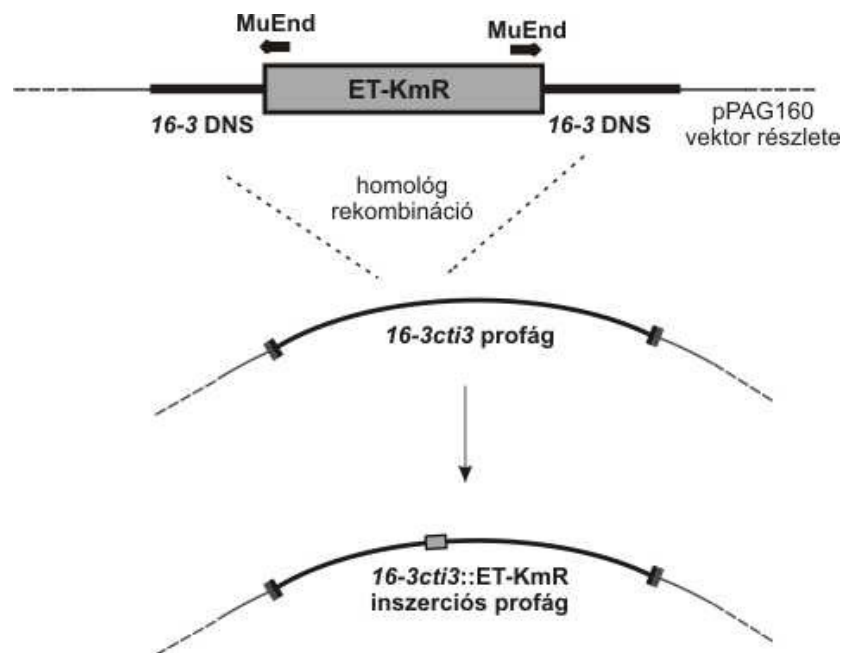
A véletlenszerűen beépülő entranszpozon inszerciókat pBluescript származékokban hoztuk létre, majd pPAG160, rhizobiumba konjugálható, de ott replikációra nem képes vektorba építettük át a mutagenizált szakaszokat. ET-KmR: kanamicin rezisztencia markert hordozó entranszpozon. SeqE és SeqW: az entranszpozonról „kifelé” irányuló szekvenálási primerek; MuEnd: PCR primer; M13 reverz: pBluescript specifikus PCR primer.

Az inszerciókat a homológ rekombináció kihasználásával juttattuk a *16-3* fággenomba. Ehhez az Rm41 baktérium olyan lizogén törzset használtuk, mely hőmérséklet által indukálható *16-3* profágot tartalmaz (*16-3cti3*) (27. ábra).

Mivel a pPAG160 vektor nem képes rhizobiumban replikálódni, konjugációt követően a kanamicin-rezisztens (a transzpozon inszerció rezisztencia markere) és egyúttal spektinomycin-szenzitív (a pPAG160 vektor rezisztencia markere) Rm41(*16-3cti3*) kolóniák profágja tartalmazta az adott fággen inszerciós allélját. Megjegyezzük, hogy ehhez az eseményhez az inszerció mindkét oldalán bekövetkező crossing-over szükséges, a folyamat során a plazmid elvész. Az egyszeres crossing-over eredménye kointegrátum képződése, amikor az inszercióval együtt a teljes plazmid beépül a profág genomba. A spektinomycin szűréssel ezeket a nemkívánatos klónokat könnyen felismerhetjük. A megfelelő mutánsok helyes kiválasztásához különféle PCR reakciókat is végeztünk: a pPAG160 vektor hiányát a vektor két eltérő szakaszára (pSC101 ori és a Spc-rezisztencia markert hordozó Omega fragment) tervezett primerpárokkal teszteltük, az inszerció megfelelő beépülését pedig a



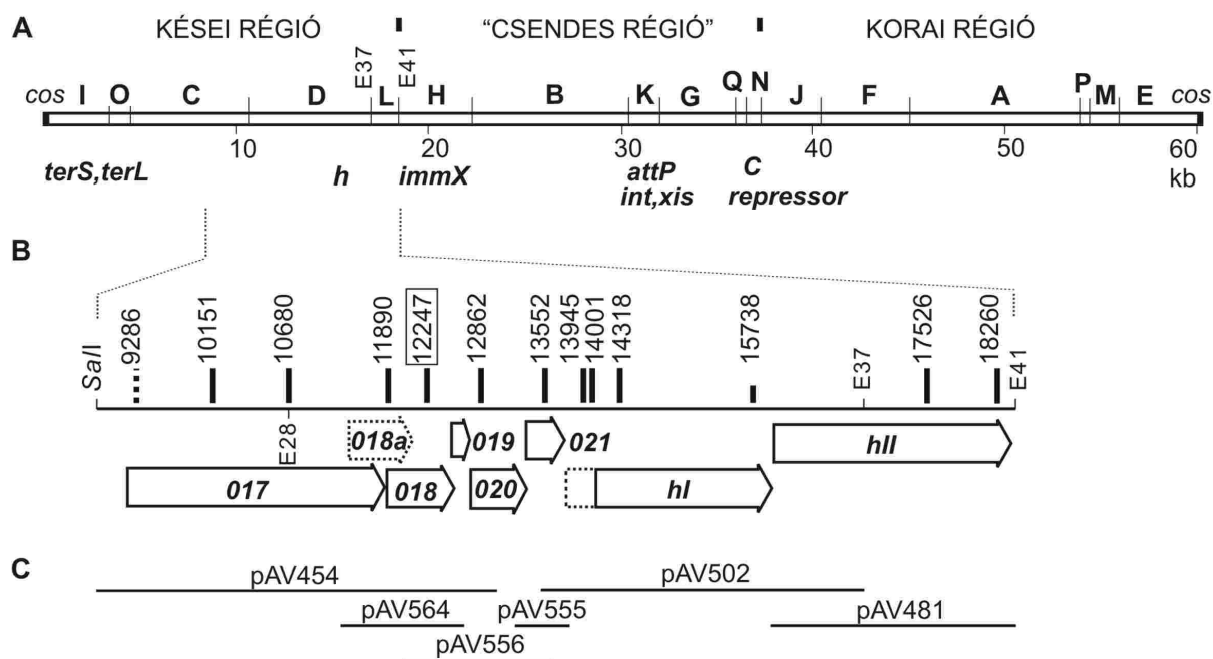
transzpozon MuEnd primerének és 16-3 DNS-specifikus primereknek a felhasználásával ellenőriztük.



## 27. ábra: A 16-3 inszerciós fágmutánsok létrehozása

A vizsgált *orf*-eket (*orf017*, *orf018a*, *orf018*, *orf020*, *orf021*, *hI* és *hII*) kanamicin rezisztencia markert hordozó entranszpozon (ET-Km<sup>R</sup>) beépüléssel plazmidon külön-külön elrontottuk (lisd. 26.ábra), majd a plazmidokat 16-3cti3 profágot tartalmazó lizogén *S. meliloti* 41 baktériumba juttattuk. Az inszerciót hordozó fágfragment és a profág megfelelő régiója között lezajló homológ rekombináció mutáns profágokat eredményezett. A kettős rekombinánsokat a plazmid eltűnésével (Spc szenzitivitás, negatív PCR a vektor szekvenciákra) és a kanamicin rezisztencia meglétével válogattuk ki. A fágok lítikus fejlődését hőkezeléssel (37°C, 20 perc) indukáltuk (lisd. 6.9. fejezet).

Terveinknek megfelelően minden feltételezett génben sikerült legalább egy mutációt létrehozni (kivéve a nukleotid adatbázisokban a DQ500118 azonosító alatt annotált, mindössze 159 bp kódoló kapacitású *orf019* feltételezett gént). A szekvenciaadatok elemzésekor viszont egy korábban fel nem ismert (a szekvencia adatbázisokban nem szereplő) nyitott leolvasási keretet találtunk, melyet *orf018a*-nak neveztünk el; ennek is létrehoztuk inszerciós allélját (28. ábra, 1. melléklet).



## 28. ábra: A 16-3 fág kései génrégiójában létrehozott inszerciók és azok komplementálása

A vizsgált *orf*-ekben (*orf017*, *orf018a*, *orf018*, *orf020*, *orf021*, *hl* és *hII*) legalább egy kanamicin rezisztencia markert hordozó entranszpozon inszerciót hoztunk létre, melyeket a **B** ábrarész függőleges vonalai jelölnek. Az inszerciókat számokkal neveztük el, a fággenomba épülés pontos koordinátái szerint. Az egyes inszerciók eltérő jelölései eltérő fenotípusra utalnak (bővebben lsd. a szövegben). A **C** ábrarész az inszerciók komplementálásához létrehozott plazmidok inszertjei által lefedett szakaszokat mutatja (részletek a 6.10. fejezetben).

## 6.9. Az inszerciók hatására fertőzőképes fágreszecskek nem tartalmazó lizátumok jönnek létre

A kísérletekben alkalmazott 16-3 $\phi$ 3 profág C represszora hőmérséklet-érzékeny mutációt tartalmaz, vagyis az *Rm41*(16-3 $\phi$ 3) törzs alacsony hőmérsékleten (28°C) lizogénként viselkedik (a fágfejlődés lítikus útja a represszor által hatékonyan gátolt), ám hőkezeléssel (37°C, 20 perc) a gátlás feloldódik, ezáltal a profág lítikus fejlődésnek indul. Hőindukciót követően további 180 percig 28°C-on növesztettük a kultúrákat, lehetőséget biztosítva a fágciklus lezajlásához, majd azt vizsgáltuk, hogy keletkeznek-e utódfágok, illetve ha igen, a vad típusú lizátumhoz képest milyen mennyiségben. Ezzel kideríthetjük, hogy az egyes inszercióknak van-e hatása a fághozamra, vagyis az általuk elrontott *orf*-knek szerepük van-e a fertőzőképes fágreszecskek kialakításában.

A 9286-os inszerciót hordozó lizátum fágszám és plakkmorfológia tekintetében nem különbözött a vad típusú lizátumtól. Ez az inszerció az előrejelzett *orf017* 7. kodonját érinti,

ezért valószínűsíthető, hogy a feltételezett géntermék N-terminálisa nem esszenciális, vagy a valós transzlációs starthely az inszerciótól *downstream* helyezkedik el.

A 10151, 10680, 11890, 12247, 12862, 13552, 13945, 14001, 14318, 17526 és a 18260-as számú inszerciókat hordozó profágok lizátumaiban a fágszám drasztikus csökkenését tapasztaltuk:  $<10^3$  plakk-képző fágreszecske számoltunk milliliterenként, szemben az átlagosan  $10^{10}$  pfu/ml vad típusú fághozammal. A mutáns lizátumok plakkjaiból jónéhányat tovább teszteltünk, és azt tapasztaltuk, hogy ezek a fágok  $Km^S$  lizogéneket hoznak létre, és PCR reakcióval sem tudtuk kimutatni az inszerció jelenlétét, vagyis ezek a fertőzőképes fágok revertánsok, melyekből az entranszpozon inszerció elveszett. Végeredményben azt mondhatjuk, hogy a fent felsorolt inszerciók mindegyike meggátolja a fertőzőképes fágreszecske képződését.

A *hI* gén 3' végének közelében izolált 15738-as inszerciót hordozó profág lizátuma esetében a fentiekhez kissé eltérő fenotípust tapasztaltunk. Itt is kaptunk körülbelül  $10^2$ - $10^3$  pfu/ml normális plakkokat képző revertánsokat, viszont, ha a tömény lizátumból a gazdabaktérium pázsitjára cseppentettünk néhány mikrolitert, 48 h inkubálást követően gyenge lízist tapasztaltunk a cseppentés helyén. Ez arra utal, hogy a 15738-as inszerció által elrontott HI fehérje bizonyos mértékig megtartotta a funkcióját. Ez az eredmény beleillik abba a feltételezésünkbe, hogy a HI fehérje a baktériumfelszín felismerésében, így valószínűleg a disztális farokvég felépítésében vesz részt. Ennek megfelelően a fágreszecske felépülésében, mint relatíve perifériális elem, nagyobb szerkezeti átalakulás mellett is részt vehet. Molekuláris szinten a 15738-as inszerció következtében a 704 aminosavnyi HI fehérje C-terminálisából 25 eredeti aminosav hiányzik, és a fehérje 19 másik aminosavval toldódik meg.

## 6. 10. Az elrontott *orf*-ek mindegyike funkcionáló gént takar

Genetikai komplementációs kísérleteket végeztünk annak bizonyítására, hogy minden általunk elrontott *orf* funkcionális gént takar, vagyis igazoljuk, hogy az egyes inszerciók fenotípusa nem a poláris hatás következtében *downstream* elhelyezkedő gének expressziójának gátlásával valósul meg.

A vad típusú *I6-3* DNS fragmenteket, melyek lefedtek egy-egy elrontott *orf*-t, pBBR1MCS-5 széles gazdaspecifitású vektorba építettük (28. ábra). A vektor gentamicin rezisztencia markert tartalmaz. A konstrukciókat konjugációval a megfelelő *orf*-ben inszerciót tartalmazó Rm41(*I6-3cti3*) lizogénbe juttattuk. A plazmidok bejutását a lizogén törzsek gentamicin rezisztenciája mutatta. A transzkonjugánsokból hőindukcióval előállított egy lépéses lizátumokat két párhuzamos baktériumgazdán titráltuk: 1) Rm41-en kontrollként;

ez a rekombinánsok és a spontán revertánsok számát adja meg, 2) a komplementáló pBBR1MCS-5 plazmidot tartalmazó Rm41 baktériumon, melyen az előbbieket mellett a letális mutációt hordozó, ám a komplementáció következtében plakkot képző fágok száma is mérhető. Komplementáció esetén az utóbbi pázsiton nagyságrendekkel magasabb ( $10^9$ - $10^{10}$  pfu/ml) fágszámot kaptunk a csak Rm41 pázsiton történő titrálás eredményéhez képest ( $10^4$ - $10^5$  pfu/ml). Minden elrontott nyitott leolvasási keret esetében a *transz* helyzetből biztosított ép *orf*-ekről képződött fehérjék jelenlétében a vad típusnak megfelelő fághozamot mértünk, tehát az entranszpozon beépülés minden esetben csakis az adott gén termékének elrontása által eredményezte a funkcióvesztést. Ezek az eredmények egyúttal bizonyítják, hogy minden elrontott *orf* esszenciális fágént takar.

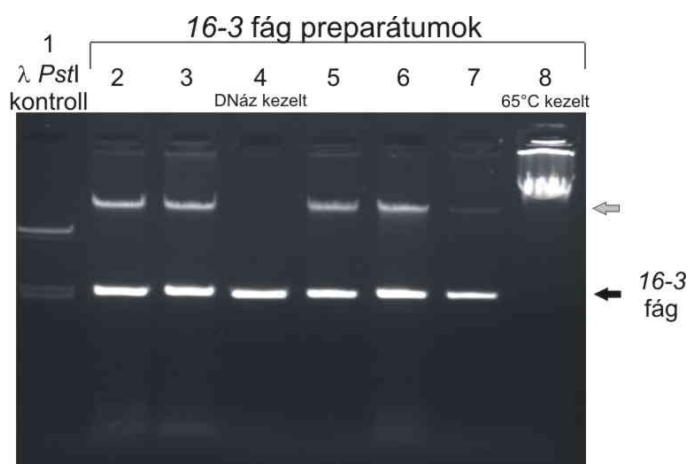
#### **6.11. Az inszerciók többsége a vad típusú fágnál nagyobb sűrűségű struktúrák összeépülését okozza**

Ahhoz, hogy minél többet megtudjunk az elrontott géntermékek funkcióját illetően, a mutáns profágok lizátumait további elemzéseknek vetettük alá. Elsősorban arra voltunk kíváncsiak, hogy a lizátumokból kimutathatók-e részlegesen összeépült fágreszecskék.

A mutáns profágok lizátumait cézium-klorid lépcsőzetes sűrűség-grádiens centrifugálással tisztítottuk. A fágreszecskék kékes-opálos sávként várhatóan az 1,45 és az 1,5 g/ml sűrűségű rétegek határán gyűlnek össze. Egyetlen lizátum (a 12247-es inszerciót hordozó) kivételével mindegyiknél izolálni tudtuk a néhány milliméter vastagságú kékes-opálos réteget, ami jelezte, hogy csak a 12247-es inszerció gátolja teljes egészében a fágreszecskék képződését. A tisztítások során továbbá azt tapasztaltuk, hogy csak a 9286-os inszerciós mutáns lizátum (vad típusú fághozam jellemzi, lsd. 6.9. fejezet) esetében alakul ki a kékes-opálos réteg a vad típusú fágreszecskék sávjának megfelelő magasságban, az összes többi mutáns esetében ehhez képest egyöntetűen néhány milliméterrel lejjebb (nagyobb sűrűségbe) álltak be a sávok. Ez arra utalt, hogy az inszerciós mutációk zöme olyan fágreszecskék képződéséhez vezet, melyek a vad típusnál nagyobb sűrűségűek.

## 6.12. Az inszerciós mutánsok agaróz gélben a vad típusnál gyorsabban vándorolnak

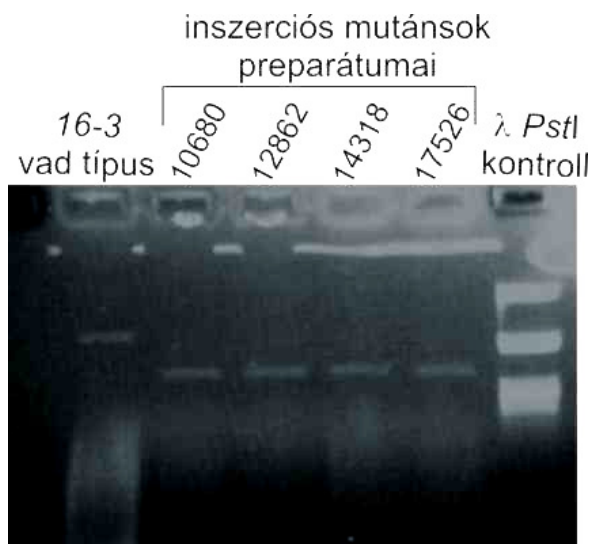
A tisztított fágreszecskekről először agaróz gélelektroforézis alkalmazásával próbáltunk információkhoz jutni (láthatóvá tehetők-e, milyen a vándorlási képességük stb.). A hagyományos, DNS-molekulák elválasztására alkalmas körülményeket, a fágreszecskek intakt megőrzésére törekedve, az alábbiak szerint változtattuk meg: a rendszerből kihagytuk a 2,5 mM EDTA-t, továbbá 5mM  $\text{MgSO}_4$ -t is tartalmazó futtatóközeget hoztunk létre. A vad típusú preparátumok esetében tesztelve ez a körülmény megfelelőnek bizonyult arra, hogy a fágreszecskeket egy diszkrét sáv formájában etídium-bromid festéssel láthatóvá tegyük (29. ábra). Az etídium-bromid tehát az elektroforézis során bejut a fágfejekbe, és a fág DNS-t megfesti.



### 29. ábra: 16-3 vad típusú fágpreparátumok agaróz gélelektroforézise

Az EDTA nélküli, 5mM  $\text{Mg}^{2+}$  tartalmú, 0,8% agaróz gélelektroforézis rendszerben a fágreszecskek diszkrét sávja (2-7. zsebek, fekete nyíl) látható az 5kb nagyságú DNS-molekula marker (1. zseb: λ fág *Pst*I emésztett DNS kontroll) magasságában. A szürke nyíl a preparátumok DNS szennyeződését mutatja, mely DNáz kezelésre eltűnik, miközben a DNáz kezelés a fehérjeburokkal védett fágreszecskek genomiális DNS-ére nincs hatással (4. zseb). 15 perc 65°C hőkezeléssel (8. zseb) a fágreszecskek szétesnek, a kiszabaduló nagyméretű genomiális DNS a zseb közelében marad.

Érdekes módon az inszerciós mutánsok preparátumai agaróz gélben gyorsabban vándoroltak a vad típusnál (30. ábra). A festődési képesség alapján ez az eredmény arra utalt, hogy az inszerciós mutánsok preparátumaiban DNS-t tartalmazó teljes vagy részlegesen összeépült fágfejek vannak. Másrészt az, hogy a mutánsok elektromos erőter hatására a térhálós szerkezetű agaróz gélben a vad típusnál gyorsabban vándorolnak, azt jelezte, hogy ezek kisebbek méretű, talán farok nélküli részecskek/fágfejek lehetnek.



**30. ábra: 16-3 vad típusú fág és néhány inszerációs mutáns agaróz gélelektroforézise**

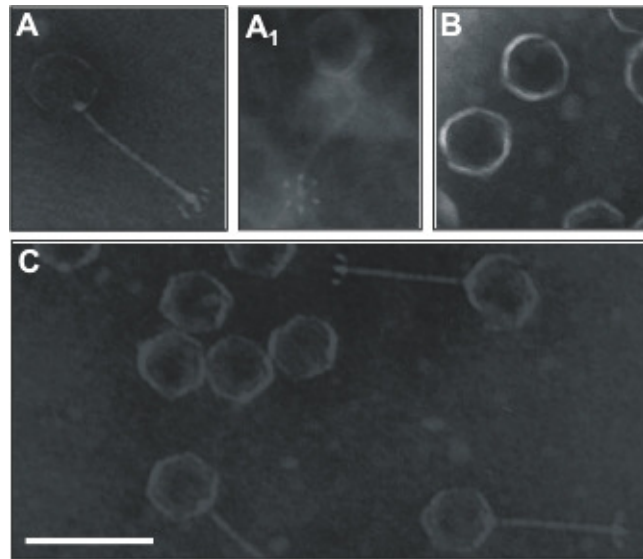
Az EDTA nélküli, 5mM  $Mg^{2+}$  tartalmú, 0,8% agaróz gélelektroforézis rendszerben az inszerációs mutánsok a vad típusú fágészecskékénél gyorsabban vándorolnak.

**6.13. Az *orf017*, *orf018a*, *orf020*, *orf021*, *orf022 (hI)*, *orf023 (hII)* gének termékei esszenciálisak a 16-3 fágfarok felépítésében**

A vad és az inszerációs mutáns fágkészítmények tisztított preparátumait elektronmikroszkópiával vizsgáltuk abból a célból, hogy információt kapjunk a képződött részecskék morfológiájáról. A vad típusú 16-3 fágról nem publikáltak még elektronmikroszkópos felvételt (Orosz László személyes közlése alapján tudtuk, hogy struktúráját tekintve a 16-3 fág nagy hasonlóságot mutat az *E. coli*  $\lambda$  fágjával). Ezért először a vad típusú fágészecskék morfológiájának meghatározása volt a célunk. A fágpreparátumokat formvar-hártyával bevont réz gridekre vittük fel, és foszfovolframsavval negatívan festettük (részletes leírás az Anyagok és Módszerek fejezetben). A vad típusú 16-3 fágészecskék átlagosan 55 nm átmérőjű izometrikus fejből és átlagosan 97 nm hosszú, flexibilis, nem kontraktilis farok struktúrából állnak. A disztális farokvég enyhén megvastagodó alaplemezen végződik, melyhez rozetta formában elhelyezkedő, 6 rövid, bunkósbotra emlékeztető faroktüske kapcsolódik (31. ábra, 2. melléklet). Ezen karakterek alapján a 16-3 fág a farokkal rendelkező fágok (*Caudovirales* rend) *Siphoviridae* családjába (hosszú, nem kontraktilis farok) sorolható.

A 9286-os inszerációt hordozó fágészecskék a vad típussal megegyező morfológiát mutattak, tehát az *orf017* 5' végén lévő inszerciónak nincs semmilyen hatása a fágészecskék képződésére. Ellenben az *orf017* területére eső más inszerciók (10151 és 10680), csakúgy,

mint az *orf018a*-t (11890), az *orf018*-at (11890 és 12247), az *orf020*-at (12862), az *orf021*-et (13552), a *hI* gént (13945, 14001, 14318 és 15738), valamint a *hII* gént (17526 és 18260) érintő inszerciók súlyos összeépülésbeli defektet okoztak. Az *orf018*-at érintő 12247-es inszerció kivételével az összes többi inszerciós mutáns lizátumában farok nélküli fágfejeket találtunk (31. ábra, 2. melléklet). Ez azt jelenti, hogy a mutagenizált gének (az *orf018* kivételével) a 16-3 fágfarok felépüléséért felelnek.



**31. ábra:** Elektronmikroszkópos felvételek a (A-A1) 16-3 vad típusú fágról, (B) egy farok nélküli inszerciós mutánsról és (C) a vad típusú és egy farok nélküli inszerciós mutáns preparátum 1:1 arányú keverékéről (skála: 100 nm) (további felvételek a 2. mellékletben).

A *hI* gén végének közelében lévő inszerció (15738) esetében a fágfejek között körülbelül 0,1-0,2 arányban farokkal rendelkező fágreszecskék is megjelentek (2. melléklet). Ez a megfigyelés támogatja azt az elképzelésünket, miszerint a 15738-as inszerciót hordozó lizátum gyenge fertőzőképessége abból adódik, hogy az utódfágok kis hányadánál összeépül a farokstruktúra, így ezek a fágreszecskék fertőzni képesek. Minden ciklusban a normális fágához képest (1 baktériumsejt 1 fággal történő fertőzését követően átlagosan 100 utódfág képződik) kevesebb fertőzőképes fágreszecske képződik, ezért figyelhattunk meg a tömény cseppentés helyén gyenge lízist (sok-sok összefolyó, apró plakk).

A *hI* gén első ATG-je előtt lévő inszerció (13945) fenotípusa megerősítette azt a feltételezésünket, miszerint a gén az első ATG-től *upstream* elhelyezkedő, nem szokványos start kodonnal rendelkezik (1. melléklet).

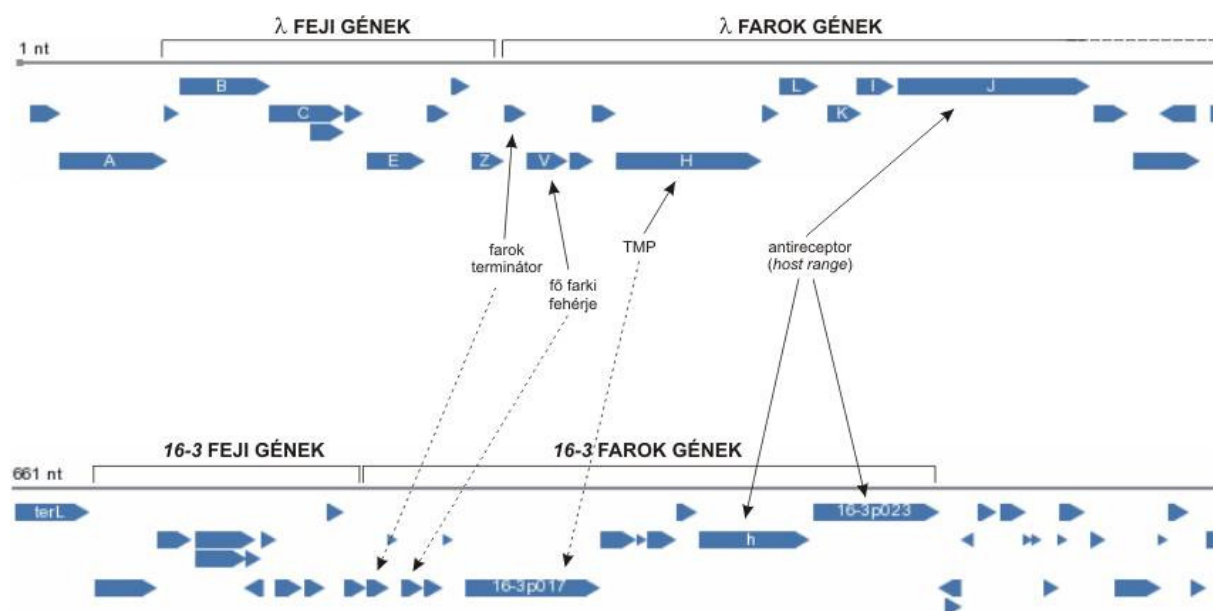
A 11890-es inszerció mind az *orf018a*-t, mind pedig az *orf018*-at érinti, és hatására összeépülnek farok nélküli fágfejek, viszont az *orf018*-ban lévő másik inszerció (12247) következtében nem tudunk kimutatni semmilyen részlegesen összeépült struktúrát sem. Ez magyarázható azzal, hogy a 11890-es inszerció csak az gp018a termelődését blokkolja, a 12247-es inszerció pedig a gp018 produkciót, mely feltehetően szükséges a fej képződéséhez.



## 7. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A *16-3* bakteriofág kései génrégiójának genetikai és molekuláris biológiai elemzése során hat olyan gént azonosítottunk, melyek termékei részt vesznek a fágfarok felépítésében (*orf017*, *orf018a*, *orf020*, *orf021*, *orf022-hI*, *orf023-hII*). Azonosítottunk továbbá egy olyan gént, mely feltehetően a fej felépítéséhez szükséges fehérjét kódol (*orf018*). A farok gének közül kettőben (*hI* és *hII*) tudtunk *host range* mutációkat izolálni, ezek azt bizonyítják, hogy a HI és HII fehérjék részt vesznek a fágreceptor felismerésében. A farok összeépülése tekintetében mind a hat általunk azonosított gén terméke esszenciális, bármelyikük hiányában részlegesen összeépült farok struktúrák sem képződnek. Ez utalhat arra, hogy a vizsgált gének termékei a fágfarok összeszerelődés első lépésében, az iniciátor komplex kialakulásában vesznek részt. Ezt a feltételezést alátámasztja a kései génrégió alábbiakban bemutatott bioinformatikai elemzése is.

A *16-3* fág és rokon morfológiájú fágok irodalmi és genom szekvencia adatainak összevetésével a vizsgált *16-3* génekhez meghatározott funkciókat próbáltunk hozzárendelni. A gyenge szekvenciaszintű hasonlóság ellenére a *16-3* fág kései génrégiójának felépítésében ahhoz hasonló elrendeződést véltünk felfedezni, mint ami az *E. coli*  $\lambda$  és HK97 fágok, valamint más *Siphoviridae* fágok esetében tapasztalható (32. ábra).



**32. ábra: A  $\lambda$  és a *16-3* fág kései génrégiójának összevetése**

Felül a  $\lambda$  fág, alul a *16-3* fág kései génrégiója (fej és farok kialakításában részt vevő gének) látható, jelölve a főbb funkciókat (folytonos nyíl: a funkció bizonyított, szaggatott nyíl: a funkció előrejelezhető). A *16-3* térképen h-val és 16-3p023-mal jelölt gének megfelelnek a jelen dolgozatban használt nomenklatúra szerinti *hI* és *hII* géneknek (forrás: NCBI genom adatbázis).

Blast homológiakeresést végezve a *16-3* nagy kiterjedésű kései génblokkját (*orf007*-től egészen az *orf023*-ig) megtaláltuk a *Sinorhizobium medicae* WSM419 genomban, de ettől eltekintve az egyes általunk vizsgált gének/fehérjék esetében egyéb homológiát nem tudtunk kimutatni a Blast keresés segítségével. A HHpred szerver algoritmusával jóval célravezetőbb eszköznek bizonyult homológia kereséshez a Blast-nál. Előnye, hogy a kérdéses fehérje másodlagos szerkezetét is előrejelzi, s ennek eredményét felhasználja a keresés folyamán, továbbá egyszerre számos adatbázissal szemben végezhetjük a homológia keresést (pl. Pfam, PDB, Interpro, Smart, Tigrfam stb.).

Az *orf017* a legnagyobb nyitott leolvasási keret a *16-3* genomban, pozíciója alapján feltételezhető, hogy a farok hosszát meghatározó TMP (*tail tape measure protein*) fehérjét kódolja. Ezt alátámasztják a bioinformatikai elemzések eredményei is. Az előrejelzett géntermék a TMP-kre jellemző módon erősen  $\alpha$ -helikális szerkezetű, és a HHpred algoritmussal számos homológ TMP-fehérje találatot kaptunk. A gp017 fehérje maximális hosszúsága 860 aminosav. Felismert tény, hogy a TMP fehérjék mérete (aminosavak száma) egyenes arányosságban áll az általuk meghatározott fágfarok hosszúságával. Szemléltetésképpen, a  $\lambda$  fág H fehérjeje 853 aminosavnyi, a farok hossza 135 nm; a közel rokon HK97 fág TMP-je 1089 aminosavnyi, a farok 177 nm hosszúságú. A *16-3* fágfarok hosszúsága 100 nm körüli, tehát a fenti összehasonlítás alapján feltételezhető, hogy a gp017 fehérje a prediktáltnál (860 aminosav) kisebb méretű. Ezt támasztja alá az az eredményünk is, hogy az *orf017* 5' végének közelében létrehozott inszerció (9286) vad fenotípushoz vezet.

A TMP-k további szekvencia-szintű sajátossága, hogy összeszerelődés után proteolitikus hasításon esnek át, ami jellemzően a C-terminális közelében (eredetileg az iniciátor komplexhez csatlakozó vég) lévő flexibilis glicin-gazdag régióban történik (Katsura, 1990). A *16-3* gp017 C-terminálisánál találtunk egy jellegzetes glicin-gazdag régiót, melynek 82 aminosavnyi szakasza 26 glicint tartalmaz (1. melléklet). A Tuc2009 fág esetében a régióban lévő GGSSGGG hasítóhelyet kísérletesen igazolták (Kenny *et al.*, 2004). Hasonló proteolitikus hely feltételezhető más TMP-k, köztük a *16-3* gp017 feltételezett TMP-ben is:

bakteriofág	TMP eredeti mérete (aminosav)	feltételezett proteolitikus hasítóhely
$\lambda$ colifág	853	708 – GGAVGGG...
HK97 colifág	1089	1019 – GTGGGG...
H7 colifág	860	714 – GGAFFGGG...
16-3 rhizobiofág	860 (?)	715 – GGLLG...

Valószínűsíthető tehát, hogy a 16-3 gp017 proteolitikus hasításon esik át, és az érett fágreszecskeben 139 aminosavval rövidebb változat (a hasítóhely alapján) van jelen, emiatt tapasztalhattuk, hogy a gélben szétválasztott fágfehérjék közül a legnagyobb méretű a 803 aminosavnyi HII fehérje.

Ismeretes, hogy a proteolitikus hasítás funkcionális következménye a fággenom beinjektálásának elősegítése az infekció során, mégpedig a baktérium sejtfal-összetevő peptidoglükán bontását végző enzim funkció (endolysin) aktiválása által (Piuri and Hatfull, 2006) (Katsura, 1990). Ezzel összhangban a Blast elemzések során egy endolysin domén jelenlétét jelezte a program a 16-3 gp017 fehérje 409-497 pozíciói között (1. melléklet). Összességében tehát több utalás van a 16-3 gp017 TMP funkciójára vonatkozólag, mely fontos szerepet tölthet be az iniciátor komplex képződésben, a farok hosszának meghatározásában, valamint a fág-DNS injektálásában. Ezeket a feltételezéseket további kísérletekkel lehetne bizonyítani.

A HI és a HII fehérjék nagyrészt  $\beta$ -hajtogatódású másodlagos szerkezetet mutatnak. Meglepő módon a HI fehérje HHpred algoritmus szerinti homológjai között nem találtunk fág fehérjéket. A HI fehérje C-terminális része (500-703 pozícióban) mutatott igen erős hasonlóságot különféle taxonómiai csoportok (*Drosophila*-tól az emberig) különféle típusú sejtadhéziós és fúziós fehérjéivel, melyek viszonylag kis méretűek, és közös sajátosságuk, hogy  $\beta$ -szendvics szerkezetű fibronektin FnIII doménnel rendelkeznek. Ez a domén kulcsszerepet játszik a protein-protein interakciókban. Fontos megemlíteni, hogy a HI *host range* mutációi, melyek a fágreceptor megváltozásához „alkalmazkodott” módosulások, az előrejelzett FnIII domén területére esnek (588. pozíció). Az utóbbi évek felismerése, hogy a rendkívüli módon konzervált FnIII domén nem ritka a fág struktúrfehérjék körében (Fraser *et al.*, 2006).

A HII fehérje kapcsán a HHpred program segítségével azt találtuk, hogy annak C-terminális része erős homológiát mutat különféle cukor-felismerő fehérjékkel, melyek különös, parallel- $\beta$ -helix szerkezettel rendelkeznek. Ezeket a fehérjéket külön alcsaládba sorolják, elsőként leírt képviselőjük a növényi sejteket fertőző *Erwinia* fajok sejtfalbontó pektát-liáz enzime volt (Yoder *et al.*, 1993). Mára egyre világosabb, hogy ez a hajtogatódási forma olyan nagy kiterjedésű felszín kialakulásához vezet, mely a különféle struktúrájú poliszacharidok „leolvasását” teszi lehetővé (Bradley *et al.*, 2001). Ezt a szerkezetet felismerték már néhány fágfehérjében is, mint például a T4 fág rövid farkirost és a P22 fág farok tüske fehérjékben. Mindkettő a baktérium sejtfelszíni lipopoliszacharidjával lép

interakcióba. A P22 farok tüske fehérje például szelektíven képes felismerni három O-antigén variánst a több, mint 1000 féle *Salmonella* O-antigén közül (Weigele *et al.*, 2003).

A *S. meliloti* – 16-3 baktérium-fág közötti felismerési folyamat vizsgálata során receptor mutációk és *host range* fágmutációk segítségével a felismerésben fontos három baktérium gént (*rkpM*, *rkpY*, *rkpZ*) és két fággént (*hI*, *hII*) azonosítottunk. Az ezzel kapcsolatos eredményeinket a 8. táblázat foglalja össze.

Fágtörzs	Fág genotípusa	Baktérium törzs (baktérium genotípusa és az egyes fágtörzsek szaporodási képessége)				
		Rm41	GH4046	PP4073	GH4180	AT313
		vad típus	<i>rkpM</i> L252F	<i>rkpY</i> L552P	<i>rkpZ</i>	<i>rkpZ</i> ::Tn5
<b>16-3</b>	vad típus	++	-	-	+	+
<b>h5</b>	<i>hI</i> G588D	++	+ *	+	++	++
<b>h105</b>	<i>hI</i> G588D	++	+	+	++ *	++
<b>h842</b>	<i>hI</i> G588V	++	++	++ *	++	++
<b>h182</b>	<i>hII</i> N666K	++	-	+	++	++ *
<b>h109</b>	<i>hII</i> D783N	++	-	+	++ *	++
<b>h843</b>	<i>hII</i> D783G	++	-	+ *	++	++

#### 8. táblázat: A receptormutációk és a *host range* mutációk jellemzésének összefoglalása

A fág genotípusa oszlop mutatja, hogy minden általunk izolált *host range* mutáció a *hI* vagy a *hII* gén területére, a *missense* mutációk helyét tekintve pedig a fehérjék C-terminálisának közelébe esik. A *missense* mutációk megadásának módja: az eredeti aminosav egybetűs kódja – a mutáció helye a fehérjében – a megváltozott aminosav egybetűs kódja. A fágban a HI fehérje 704, a HII pedig 803 aminosav hosszúságú, a baktériumban az RkpM fehérje 387, az RkpY pedig 1024 aminosav hosszúságú. Az aminosavak egybetűs rövidítései: G – glicin, D – aszparaginsav, V – valin, N – aszparagin, K – lizin, L – leucin, F – fenilalanin, P – prolin. A + és – a szaporodási képességre utal, a \* pedig jelzi, melyik baktérium törzsön izoláltuk az adott fágmutánst.

Eredményeink arra utalnak, hogy a fágreceptor kialakításában közvetlenül vesz részt az RkpM és az RkpY fehérje, ugyanis a GH4046 és a PP4073 törzsek ezen fehérjék olyan speciális *missense* mutáns változatát termelik, melyek – más változatokkal ellentétben – lehetővé teszik *host range* fágmutánsok izolálását. Az RkpM és az RkpY fehérjék eredeti funkciója a K<sub>R5</sub> antigén bioszintéziséhez köthető, a jellegzetes mutáns poliszacharid fenotípus a GH4046 és a PP4073 törzs esetében is jelentkezik (lsd. 6.2. fejezet). Viszont a fágfertőzés szempontjából az *rkpM* és *rkpY* gének egyéb mutáns alléljait hordozó törzsekhez viszonyított eltérő fenotípusuk arra utal, hogy ezek a fehérjék nem/nemcsak a poliszacharid termelésre gyakorolt hatásuk által, hanem közvetlen fizikai kapcsolatban részei a fágreceptornak. Topológiájukat tekintve a fágreceptor részeként funkcionáló fehérjék a külső/belső membránban vagy a periplazmatikus térben kell, hogy elhelyezkedjenek. Az RkpM kapcsán laboratóriumunknak van olyan eredménye, mely igazolja, hogy annak meghatározott részei a periplazmatikus térbe nyúlnak (Tn*phoA* transzpozon segítségével csak

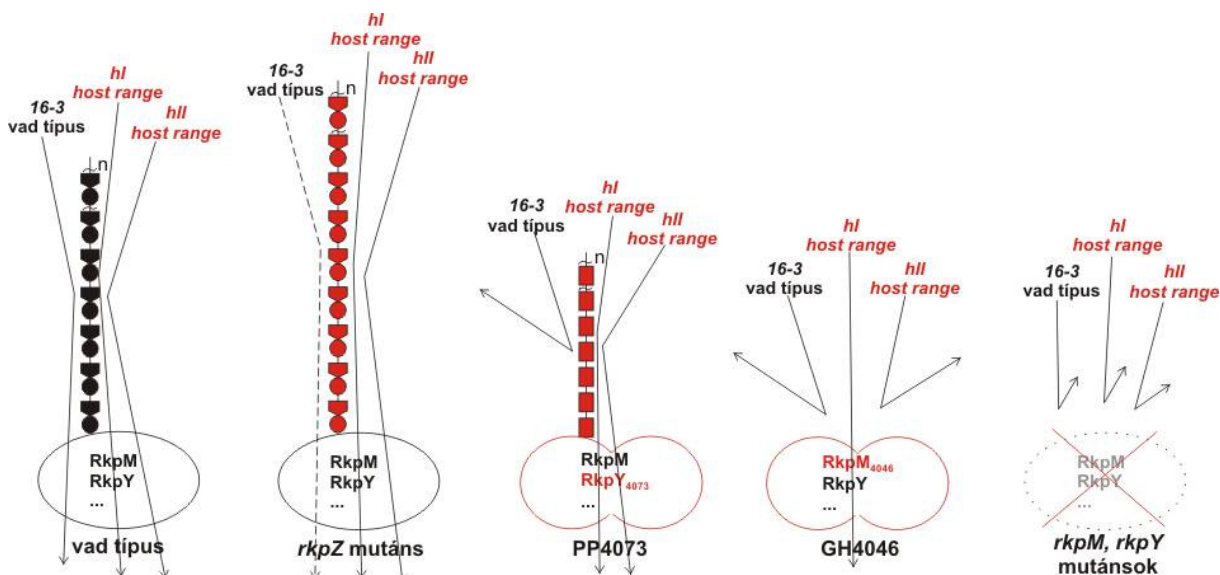
a periplazmatikus térben aktív PhoA fúziót lehetett izolálni az RkpM-ben, Nagy Tibor munkája). Az RkpY esetében egyelőre csak az *in silico* prediktálható transzmembrán domének utalnak annak membránhelyzetére. Feltételezzük, hogy mivel ezek a fehérjék egy bioszintézis és/vagy export folyamatban (K<sub>R5</sub>-antigén) vesznek részt, egy olyan komplexben helyezkedhetnek el, mely átível a külső és a belső membránon, és ez a komplex egyúttal receptorként szolgálhat a 16-3 fág számára. Az RkpM<sub>4046</sub> és az RkpY<sub>4073</sub> fehérjékben olyan mértékű változás történhetett a vad fehérjékhez képest, mely még „megengedi” a fágreceptor összeállását, de annak konformációja úgy változott, hogy a vad típusú fág már nem, viszont egy speciális mutáció következtében a *host range* fág képes ahhoz kötődni.

Egy harmadik baktérium fehérje, az RkpZ szintén befolyásolja a fágfertőzést, viszont nem direkt módon, ugyanis nullmutáns változata is lehetővé teszi *host range* fágok izolálását. Ez az eredmény arra utal, hogy az RkpZ fehérje közvetlenül nem vesz részt a fágreceptor kialakításában, de hiánya közvetetten befolyásolja a fágfertőzést. Az *rkpZ* mutánsok eddig ismert fenotípusa *S. meliloti* 41-ben az, hogy a vad típusú K<sub>R5</sub> antigénhez képest nagyobb lánc hosszúságú polimert termelnek (Reuhs *et al.*, 1995). Ennek fényében a K<sub>R5</sub> antigén szerepe továbbra is feltételezhető a 16-3 fágfertőzésben. Vannak olyan eredmények, melyek szerint  $\beta$ -glükozidáz és  $\beta$ -glükuronidáz kezeléssel meggátolható a vad típusú 16-3 fág adszorpciója a tisztított *S. meliloti* membránhoz (Putnoky and Kondorosi, 1986). Mindez arra utal, hogy a vad típusú fág adszorpciójában poliszacharid jellegű komponens is részt vesz.

A *host range* fágok gazdaspecifikusságának tekintetében lényeges, hogy a GH4046-os baktérium törzsön izolált *host range* mutációk mindegyike a *hI* gént érinti, és ezen a baktériumon nem is nőnek a *hII* gén mutáns allélját hordozó *host range* fágok. Ezzel szemben a PP4073 és a GH4180 törzseken izolálhatók/szaporodni képesek mind a *hI* mind pedig a *hII* *host range* mutánsok. Úgy gondoljuk, hogy ez a különbség a baktérium törzsek eltérő poliszacharid termelésével magyarázható: míg a GH4046 törzsben teljesen megszűnt a kapszuláris poliszacharid termelése, addig a másik két törzs megváltozott szerkezetű vagy lánc hosszúságú (PP4073 – Kdo homopolimer, GH4180 – nagyobb lánc hosszúságú K<sub>R5</sub> antigén) poliszacharidot termel (Reuhs *et al.*, 1995) (Palvolgyi *et al.*, 2009). Fágkötési tesztjeink eredményei szerint a vad típusú 16-3 fág megtapadása a kapszuláris poliszacharidot nem termelő GH4046 törzsön 50% alatti, ellenben a valamilyen K-antigént termelő PP4073 és GH4180 törzseken 95% feletti. Tehát úgy tűnik, hogy a tökéletes adszorpcióhoz szükség van a kapszuláris poliszacharidra is. Megjegyezzük azonban, hogy a fágfertőzés további lépéseihez egyéb elemek is szükségesek (ld. fent, az RkpM, az RkpY, és esetleg még más

fehérjék komplexe). Ezt igazolja, hogy a PP4073 törzs teljesen rezisztens a vad fágra, annak ellenére, hogy felszínén azok 95%-ban adszorbeálódnak.

Eredményeink alapján valószínűsíthető, a GH4046-os törzsen szaporodni képes *hl host range* fágok hatékonyabb kötődésre képesek a fágreceptor fehérje komponenséhez, míg a *hII host range* mutánsok a megváltozott szerkezetű kapszuláris poliszacharidhoz való alkalmazkodás reprezentánsai. Más megvilágításban: a HI a fehérje-fehérje interakcióban, míg a HII a fehérje-poliszacharid interakcióban vesz részt a fágfertőzés során. Ezt támasztják alá a HI és HII fágfehérjék bioinformatikai elemzésének eredményei is (lsd. fent). A továbbiakban érdekes lehet a HII kapcsán vizsgálni, hogy rendelkezik-e poliszacharid degradációs aktivitással. Az eredményeink alapján felállított fágfertőzési modellt szemlélteti a 33. ábra.



### 33. ábra: A 16-3 fágfertőzés modellje

*S. meliloti* 41 baktériumban a 16-3 fág receptora a kapszuláris poliszacharid és annak bioszintézisében/exportjában részt vevő feltételezett fehérjekomplex tagjai, az RkpM és RkpY fehérjék. A HI *host range* mutációk a fágreceptor fehérje komponenséhez hatékonyabb kötődést eredményeznek, és a poliszacharid jelenlétében és hiányában is sikeres infekcióhoz vezetnek, de ennek feltétele a fágreceptor fehérje alkotóinak összeépülése. A HII fágfehérjében mutáns *host range* fágok izolálásának/fertőzésének feltétele a kapszuláris poliszacharid megléte, annak szerkezetében bekövetkező változásra a *host range* fágok a HII fehérjében létrejövő *missense* mutációval „reagálnak”.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A 16-3 fág a *S. meliloti* 41 törzs temperált, dsDNS genommal rendelkező fágja. A 16-3 a legintenzívebben tanulmányozott rhizobium fág, a rhizobiumgenetika fontos eszköze (szimbiotikus mutánsok izolálása, speciális vektorok kifejlesztése). Több fontos lókuszt azonosítottak, és számos fágfejlődési mechanizmust részletesen vizsgáltak a fágban. Elkészült a teljes, 60 kbp hosszúságú fággenom DNS szekvenciája is.

Doktori munkámban a *S. meliloti* 41 baktérium és a 16-3 fág közötti felismerési folyamat molekuláris megismerése céljából megváltozott szerkezetű receptorrall rendelkező baktérium mutánsok, valamint a változáshoz alkalmazkodott *host range* fágmutánsok izolálását és elemzését végeztük. Megállapítottuk, hogy a fágreceptor fehérjekomponensének része a baktérium RkpM és RkpY fehérjéje. A fág adszorpciójához szükséges a baktérium kapszuláris poliszacharidja is. Az *rkpZ* gén is szerepet játszik a fágfertőzésben, de maga az RkpZ fehérje közvetlen módon nem része a fágreceptornak, hanem feltehetően a poliszacharid-termelésre gyakorolt hatása által befolyásolja a fágfertőzést. A fágban azonosított *host range* mutációk mindegyike a HII és HIII fehérjék C-terminálisára esik, ami bizonyítja, hogy ez a két fehérje alkotja a 16-3 fág antireceptorát. Eredményeink arra utalnak, hogy a 16-3 fágfertőzés kétlépéses folyamat: az első, poliszacharid-függő felismerésben fontos szerepe van a baktérium K<sub>R</sub>5 antigénjének és a fág HIII fehérjének, ezt egy fehérje-fehérje kölcsönhatás követi, melyben a baktérium RkpM és RkpY, valamint a fág HI fehérjéje vesz részt.

N-terminális aminosav-szekvencia meghatározással bizonyítottuk, hogy a HIII fehérje részt vesz a fágreszecske felépítésében. A HIII fehérjében lévő hőmérséklet-érzékeny *host range* mutáció segítségével igazoltuk, hogy a HIII fehérjének a *host range* mutáció által érintett része kulcsfontosságú mind a fehérje-poliszacharid kommunikációban a fágfertőzés során, mind pedig a fágreszecskek összeépülésében.

Elektronmikroszkópos vizsgálataink szerint a 16-3 fág - morfológiai jegyei alapján - a *Siphoviridae* családba sorolható. A fág kései génrégiójának inszerciós mutagenézisével hat olyan gént azonosítottunk, melynek terméke részt vesz a fágfarok felépítésében (*orf017*, *orf018a*, *orf020*, *orf021*, *orf022-hI*, *orf023-hII*). A génekben létrehozott inszerciók fertőzőképtelen, farki struktúrával nem rendelkező fágfejek kialakulásához vezettek. Egy inszerció esetében (az *orf018*-at érintő 12247) nem tudtunk kimutatni semmilyen fágreszecske-szerű struktúrát a lizátumból, ami arra utal, hogy ez a gén feltehetően a fej felépítéséhez szükséges fehérjét kódol.

## 9. SUMMARY

Phage *16-3* is a temperate double stranded DNA phage of *S. meliloti* strain 41. It is the far best studied rhizobiophage that serves as a tool in rhizobium genetics, in isolation of some symbiotic mutants and in construction of special vectors. Genetic determinants and molecular mechanisms of many aspects of the *16-3* life cycle have been examined in detail. The complete 60 kbp phage genome sequence has been determined recently. However, little is known about the genes and structural elements involved in the interaction between the phage and its host, and furthermore, only one study have been reported on the *16-3* virion proteins.

In order to elucidate the molecular mechanism of phage *16-3* and *S. meliloti* 41 recognition, bacterial mutants carrying an altered phage receptor and host range phage mutants able to overcome the adsorption block have been characterized. It was shown that the RkpM and RkpY proteins are components of the phage receptor, together with the K<sub>R5</sub> antigen. Contrary to RkpM and RkpY, it is likely that protein RkpZ does not take part in *16-3* receptor formation, but influences phage adsorption through its effect on capsular polysaccharide production. All of the isolated *16-3* host range mutations resulted in amino acid residue substitutions in the C-terminal part of proteins HI and HII, so HI and HII form the antireceptor in phage *16-3*. Based on our data, it seems likely that K<sub>R5</sub> antigen of the bacterium and HII protein of the phage are involved in initial polysaccharide controlled phage binding, which is followed by a protein dependent (RkpM, RkpY of the bacterium and HI of the phage) secondary binding step. We provide direct evidence (by N-terminal amino acid sequencing) that host interacting protein HII is present in the phage particle. Temperature shift experiments indicated that the part of the HII protein affected by the temperature sensitive host range mutation is not only involved directly in the interface of the protein-polysaccharide “communication” during adsorption, but it is crucial for the assembly of phage tails as well.

We examined by insertional mutagenesis a region of the phage chromosome supposed to be responsible for tail formation and identified seven new genes essential for phage assembly. Based on our electronmicroscopic investigations, phage *16-3* can be classified to the *Siphoviridae* family. Insertional mutations in ORFs *017,018a*, *020*, *021*, *hI* and *hII* resulted in the development of head structures only, and these particles were unable to infect the host. Therefore, we concluded that all of these ORFs represent functional genes essential for the tail formation. In the case of insertion 12247 in *ORF018* no virions were detected in lysates, therefore gp018 must be essential for phage head formation.



## 10. MELLÉKLETEK

### 1. melléklet: A vizsgált 16-3 gének és az általuk kódolt fehérjék szekvenciája

A számmal jelölt fekete nyilak a létrehozott inszerciók pozícióit mutatják. A besatírozott részek valamilyen kiemelt szerepet jelölnek: *orf017* sárga – endolysin domén; kék – glicin-gazdag régió; *orf hI* szürke téglalapok – GGAG riboszóma kötőhely, TTG lehetséges start kodon, első ATG, transzkripció terminációs szignál, kisbetűs bázisok jelölik a nem kódoló szakaszokat; sárga – FnIII domén; piros – a *host range* mutációk által érintett triplet; *orf hII* szürke – a fehérje szekvenálásával azonosított N-terminális vég; sárga – a parallel  $\beta$ -helix szerkezet kiterjedése; piros – a *host range* mutációk által érintett tripletek.

#### *orf017*

9286

ATGGCCGCAATGACGATACCGCTCGCCTGTTAGTTTCGATCGAGGCGACGCGAGCGAAGTTCGCCAAAGACATGGCTAGGATCGCAAAGGCTGCTGGCGATACGGCGACTGGCGTTGAG 120  
M A A N D D T A R L L V S I E A T Q A K F A K D M A R I A K A A G D T A T G V E  
CGCACCTTTCAAAGGCCAACGACAACGTCGGCCGGAGCTTTGAACGGGGTACGCGCAGGCAACGTCGCCCATGAGTCTGCTGTCAGCGGTCTCAACCTCTCTTTTCAGTTGAAC 240  
R T F Q K A N D N V G R S F E R G S R Q A T S A M R S S S A A V S N L S F Q L N  
GATATCGCGATGGGGCTGCCCTCGGGCAGCTGCCGTTACGATCATGGTGCAGCAGGGAAGTCAAGTGTGCAAGTCTGTCAGGGGAGCGCGCCCTCTGGGTGCCGTGAAGACGCTC 360  
D I A M G L A S G T S P F T I M V Q Q G S Q V S Q V L Q G S G G L L G A V K T L  
GGCGGCGGTTTGGCAGATGGTCAATCCGCTCTCGCTGGCGTCAATTGGCCGTGATCGGCTGACTGGCGTGTCTGCAATACCTCAGACGCTAGGCTCCGGCGTCCGGAAACCGAG 480  
G G A F A T M V N P V S L A S F A L I G L T G A A V Q Y L T T L G S G V P E T E  
GAGCTTCTGAAGGACATGCCAACCTCATCAATCGTTCGACGAGGCGTGGGGCTGCGCGGAGAAGGCTGCAAGGAGTACTCCGACGCGCTCAAGCAGATCGAACTGCAGAACTGAAA 600  
E L L K E H A N V I K S F D E A W G V A E K G V K E Y S D A V K Q I E L Q K L K  
GACGAATTTGGCAGCTGCAGGCGGCAATCAAGGCGGACGCGACCTGGCTGGCGAAATCTCGGTATCTCTGTGATGAGTTGGCGGCGGCAAAAGTCAGTCGCGGACTTCAAT 720  
D E F G S L Q A A I K A A G D D L A G E I L G I S V D E F G G A T K S V A D F N  
CGGGCGCTTTTGTGCTCGAGCAGGACATCCCGACTTCGCGAGTTCTCAATCGAGATGGGCAAGATGAGGAGATGACCGGCATCCGAAACAACATTCCGGAGCTGCCAAGCAGTTG 840  
R A L L L L E Q D I P D F R Q 10151 I E M G K I E E M T G I P N N I R E L A K Q L  
CGCCTGTCTGCGCAGGAATCGTACCGCTGCAGGATGCGCTGGAGGAGCGGACAGCGCTGAACGTCATTGCTTGGCGCGGAAGATCGAAGGCTGCGTTTGCAGCGCTCACTTCG 960  
R L S A Q E S L P L Q D A L E E A D K R L N V I R L S A E D A K A A F A A L T S  
TCCGCACTCGGCATGGGCGAGGCTGGCGGGATGCGGTGAGCACCATCGCAGCAAGTCAAGAAGCACCTTATCCCGGCGATGACGAGGCCATTGAGCAGGTTGCTGAATATGCCAAG 1080  
S A L G M G T A G G D A V S T I A A K V K N D L I P A M T Q A I Q Q V A E Y A K  
AATTTCACTGAGGAGCAGGTCAACAAAACCCGCTAGGCGAGTTGTCGCCGATTTTTCCGGCGTGGGCAATCTCAATGAAGACGAGAACACACATTCCGCGCAGCGGAA 1200  
N F S S L Q E Q V N K N P L G Q L S P I F S G G G Q F L N E D Q N N T F R A G E  
GAACGATACCGAATACCGCGGAGAGCGCGCGCGCAGATGGTCAAGGGCTTTGAGGGCTTCAATTTCCAAGGCCAAGTGGGACGTTAATCGGTTCCGTTGGCTTCGCGAGTACACT 1320  
E R Y R I A G E S A A A Q M V K G F E G F I S K A K W D V N 10680 V G F G S D T  
GTACGCGCGCTAACCGCGCCATCGAGAAAGTCAACAAAGACAGGCTGTTTCACTGGCGGATGCGCAGCGTGATCTGAGCGCGGATGTTGGTGAATTCGAGAACGGGATCCAGCAGGCG 1440  
V T R A N G A I E K V T K D T V V S L A D A Q R D L E R R L V E F Q N G I Q Q A  
GTGCTATCGACACATGGAATAGCTAAACGAGCGCGCAGCAGCGCTCTGACGAGCATCGCCTATAACTACGTTGAGCTGCCGCGCGCATTGTTGCGCGGATTGAAGCGCGCGCGG 1560  
V G I D T W N S L N E A Q Q A A L T S I A Y N Y G E L P Q R I V A A I E G G G G  
GCAGAGCCGTGGCAACCGGATGTGTCGCTCGGTAGCGACAACGCGGCATAAACAGCGTGGCGCAACGAGGCGCAAGCGTTCCTGTGTCGCACTGGCATCTCCACGAGTGAG 1680  
A E A V A N A I A G L G S D N G G I N K R R R N E E A Q A F L S G T G I S T S E  
GCTGGGCTAGGCGCGCAGCGCAAGAAGCGCTCGGAGTTGTTTCAAGGTGACGTTGACGAGATCCAGGCGCGCATCGCGCGCTCAACCGCGAGTTCAAGCGCAATCTCGCCTCAAC 1800  
A G L G A S G K K T P A E L F Q G D V Q Q I Q A R I A A L N A E F E A Q S R L N  
CCGCTCGTCACAGACTACGGTTATGCCGTTGAAAAGCGCAGGATAGAGCAGCAACTGCTGTCGAGGCGCAGAAAGCGGCTTGAAGTACCGCGGAACTTCAGGCGCAGATTGTTGCC 1920  
P L V T D Y G Y A V E K A R I E Q Q L L S E A Q K A G L E V T P E L Q A Q I G A  
CTGGCTGAAAATTACGCCAAAGCGTCTTCGGCAGCGAACGCTGAAGGACTCGCAGCAAAAGCGGTTGACGACGCAAGCAGTTCTCCGGTCTGGGGCAGGAGTTGTCGGCGGCTTC 2040  
L A E N Y A K A S S A S E R L K D S Q Q K A V D A A K Q F S G L G Q E V V G G F  
ATCAGTGATTTCGCTAGCGGCGCTCCGCGCAGAGCGCTGAGTAATGCGCTGAACAAGTCTTCGACAAGATCATGATATCGGTCTCGAGAGCTATTCTCTGGCGGCTTCTCGGT 2160  
I S D L R S G A S A A E A L S N A L N K V L D K I I D I G L E S L F S G G L L G  
GGTGGCGGAGCGGCGGCTACTTGGTGGCTTCTCATCCCGGAATCTGTCACAGCGCGGTTGTCGCTGGCAAGGATGGCTACGGCATGGCCGCGCGTTCTCCGCTACGTTTCGCA 2280  
G G G A G G L L G G F L I P G I L H S G G V A G K D G Y G H G R A V S P S T F A  
GGAGCCAAGCGTACCACACAGCGCGGCTTCTGTCGCTGCGGGAAGTCCCGGATTCGCAACGCGCGAGGTTGTTTTCGCTAGGGTACGAAGTGGGAGGCGCGCAGCAG 2400  
G A K R Y H T G G V A G L M P G E V P A I L O R G E V V L P R G T K M G G A Q Q  
GTGACGTCACCGTCGAGTGTGCGCTGATAACAACGGAATCTTTGCGGTTGCTGAATCGGATCGCAAAACCGTTTCCTCCGCGGCGCCAAAATCGTGTCTGTCGCAATCAG 2520  
V H V T V G V S A D N N G N L L P F V E S V S Q K T V S S A A P K I V S A A N Q  
CAGGTGGTTCCGACTATGGCGGCTCATGAAAAATAAGCGGGTGCTGAATGGCGCTGA 2580  
Q V V P T M A A H Q K N K A G A E W R

### orf018a

```
ATGGCTACGGCCATGGCCGCGCGTTTCTCCGTCTACGTTCGACAGGAGCCAAAGCGCTACACACAGGCGCGTTGCTGGCCTCATGCCGGGAGAAGTGCCCGGATTCTGCAACGCGGCG
M A T A M A A P F L R L R S Q E P S A T T Q A A L L A S C R E K C P R F C N A A 120
AGGTTGTTTTCCTAGGGGTACGAAGATGGAGGCGCGCAGCAGGTGCACGTACCGTCGGAGTGTCCGGTGATAACACGGAATCTTTTGCCGTTCTGTTGAATCCGTATCGCAAAAAA
R L F C L G V R R W E A R S R C T S P S E C R L I T T E I F C R S L N P Y R K K 240
CCGTTTCTCCGCGCGCCCAAAATCGTGTCTGCTGCAAAATCAGCAGGTGGTTCCGACTATGGCGGCTCATCAGAAAAATAAGCGGGTCTGAATGGCGCTGATTATCGAATGCCCACT
P F P P R R P K 11890 L L Q I S R W F R L W R L I R K I R R V L N G A D Y R M A T 360
CTGCGTCTTCGCCACAATCCGCATCCGCCAACCTCGTCCGTTTCAGCAGAGCGGAGGCGGAACCTCTGGCGGCATCGAACCATCTACTCGGACGGACCTCGGATTTTGGGCAATCGA
L R P S P T I R I R Q P R A V Q Q E R R A N S W R H R T I Y S D G P R I L G N R 480
CTATCAAAACGTCGTCTCTCAGAACCGCAACCGCGAGCAATGGCAAACGTGGAACGCCATAGCCAGAACTAGGCGGCCCTGGCCCTGATCGCCGTGCGCGTTCGCTCGTCTGCTGTC
L S K R R P P E P Q P R A M A N V E R H S P E T R R P P W P D R R A R S L V A V 600
GGCGCCTTACGTCTCCGGCAAATTCGAGCCGGTTATCGAGACGGACCAAGCAGCAGCAGCCGTTTGA
G A L R L R Q I R A G Y R D G P Q R R Q P V . 669
```

### orf018

```
ATGGCGCTGATTATCGAATGGCCACTCTGCGTCTTCGCCCAACATCGCATCTCCCAACCTCGTGCCGTTTCAGCAGGAGCGGAGGGCGAACTCTTGGCGGCATCGAACCATCTACTCGG
M A L I I E W P L C V L R P Q S A S A N L V P F S R S G G R T L G G I E P S T R 120
ACGGACCTCGGATTTTGGGCAATCGACTATCAAAACGTCTGCTCCAGAACCGCAACCGCGAGCAATGGCAAACGTGGAACGCCATAGCCAGAACTAGGCGGCCCTCGGCTGATC
T D L G F W A I D Y Q N V V L Q N R N R E Q W Q T W N A I A Q K L G G R P G L I 240
GCCGTGCGCGTTTCGCTCGTCTGCGGCGCTTACGTCTCCGGCAAATTCGAGCCGGTTATCGAGACGGACCAAGCAGCAGCAGCCGTTTACGACGACGACCCGTTTACGACGACGACCCATACACGCAAGGC
A V R V R S S L S A P Y V S G K 12247 P V I E T D H S D D S P F D D D T P Y T Q G 360
GCCATATCGGTCGTTACCGATGGCGTGACGGCGGTAGGCGCTACGTCGATCCGGGTCGCGCATCATCAACGCCGACGCCAACCTTGTGGGGTGCAGTTCAGCTACAACACGCCCCCTTAC
A I S V V T D G V T A V G A T S I R L R I I N A D A N L V G V R F S Y N H A L Y 480
GAACTGGGCGCGTTACGGCGGTGGATGGCGACATCTGGACCGTGCCGATTTCCGCCGTCGGTGCAGCACTATTCTCTGCCGCGCCGATCTCGAGTTCGACGACGCGGACGTCGCTCTGC
E T G P V T A V D G D I W T V P I S P S V R E L I P A G A D L E F D Q P T C L C 600
CACCTGGCGGAGGATCGCGCATGGACATCGACCAGAACGCGGTCGGGAAGTTTTCGTTGCCGCTCTGTCTCGTTTTCGAGGCGGTGGATTATTGGAATCAGTAG
H L A E D R G M D I D Q N A V G K F S L P S V S F V E A V D Y W N Q . 705
```

### orf020

```
ATGTCCATTAAATCACTGCGCATCCTCTGCGACGTCGTGTGCCAGAGGAGACCATTTCGCGTGTGGGATGGCTCGGGCGGCACGTTTCGTTGACGGCGACGGCAACTTCTACAGCCGCGCG
M S I K S L R I L 12862 V V L P E E T I R V W D G S G G T F V D G D G N F Y R P A 120
CAGTTACCGGAGGACGCGCTCGCAATCGCTCGAGGCGGCCATCAACGGCGAGGCTTACACGCTCGCGCTGTCTGCTGATTTCGGTTAGCCAGTCGGCTGCGGATAGCATCTGGGAATATGAC
Q F T E D A L Q S L E A A I N G E A Y T L A L S L I S V S Q S A A D S I W E Y D 240
GAGACGGCCAGCGTGCAGGGCTCGCCGTTTTCGTTGAAGTTGCAGATCTCGACGAGGACGAACAGCCGACAGCGATCCGATCGTGGTGTTCGCCGCGAAATCGCAACCTCGATGTT
E T A S V Q G S P F V V K L Q I L D E D E Q P D S D P I V V F A G E I D N L D V 360
GCTGACGAGTCCACGGCGACGGCATTACGTCGGTCTCAATCTGGAAGTCACCAACCGCTTACGCTGCGTACCGTCACCAACGGCGCGGTTCTTTTCGGACGTCGACGACGGCGCGCGG
A D E S T A D G I T S V V N L E V T N R F T L R T V T N G A V L S D V D Q R A R 480
GCAGCTTTGCTCAATCCATCGCGCGGCGGACGAGGTTCTGCAAGCGCGTCCCGCTGATGCGGGATCAGACGATTAAATGGCCCAACTGGTAG
A A L L N P S A A D D E F C K R V P L M R D Q T I K W P N W . 573
```

### orf021

```
ATGGCCCAACTGGTAGCGGCTGACGAACTAGCCGCTTCCTCGCTGACAACAACGCTCGCACTTGGCAACCCGGGCCAAGTGGATTGCTGCATGGTGCTCGCAGACTGGGCGGCTTGGCTC
M A Q L V A A D E L A A F L A D N N A R T W Q P G Q V D C C M V L A D W A A W L 120
GGCCATCCGGACCCCGCCACACCTTCGAGGGCGCTACGACAGCGACGAGGGCTTCGCGGCCATCATAGCGGCTGCGGGTAGCGTTCTTGCCCTGGTGCCCAAGTGTGTGCTGCCAGT
G H P D P A A H L R G A Y 13552 E G F R A I I A A A G S V P A L V A K C V P A S 240
GGCAAGCGCATCCAGCACCCGCGAGCGCGGCCATCGCGCTCATCGGACGCCATCAAAACATTATCGCCAGTTCGGCGCCATCCACGACGGCAGTGGATGGCTCGTGCATGCACGGC
G K R I Q H P Q R G A I G V I G S P S N I H R Q F G A I H D G S G W L V R M H G 360
GGCTTCGGCCGAATGACGGCGAAACTCTTGGCGCTGGGAAATCCGGTAG
G F G R M T A K T L A A W E I R . 411
```

## orf hI

tgacggcgaaaactcttggcgctgggaaatccggtagccgggaacgaggagttaccaatTTGCCAGGCATTATCGAGACCATTTCGCTGATCGTGTCTTCGCTGGCGACGACGACGCC 120  
R R K L L R P G K S G S R G R G V T N L P G I I E T I S L I V S S L A T T T A  
CTGGCCAAACGCGCTTACCTCGGCACGTCGGCGTGTCTTACGGCGGCATCGCGGCCGAGGCTTAGCGCTGCAGGGCGCGTTCGCTTCCAAGCCAGCGTGCCGAAGCCAGACGACGCC 240  
L A N A L Y L G T S A L L Y G G I A A G 13945 A L Q G A F A S K P A V P K P D 14001  
AGCTATACTGAAACAGAGCGTTCCGTCGTCGCTTACGTGCTCGGGCGGTCAGGAAGGTTAGCGATTACGTCTTCTAGAGGAGAAGGCCGCAAGGCCACCATCATGGTGTGG 360  
S Y N L K Q S V P S L P Y V L G R V K K G S D Y V F L E E K G G K A H H I M V W  
GCGGGCATCGCATACATCGCTTCGCTCCCACTACCTGCATGACGAAAAGGCCACCTGAACGTCGACGGTGGCGTGACCGAGCCAGGCCATTACGACAAGGACGGTGTCACTTCGTT 480  
A G H R I H A F V S H Y L H D E K A T L N V D G G V T E P G H Y D K D G V S F V  
CACATCAAGACGAAGCTCGGGCTGAACGCCGAACCGCATATCCGACGTAGTTACCGCCTTCCGACCATTGGGACAACTGCCGCGAGATGGACTCGCGTCTGTCTACATGACG 600  
H I K K T A L L G L N A E T A Y S D V V T A F P T I 14318 N N C R G D G L A S V Y M T  
TGCAGACTGTGATCAGAAAGCTTTCTGGATGTCTACCCGAACCATGCGGAGCATTCGCGCGTTGGTGACGGCGCTTCTGTATGATCCGCGCAAGACGACCGCAGGGCGGA 720  
C R T V D Q K D F L D V Y P N Q M P E H S A V G D G A L L Y D P R K D S T Q G G  
TCCGGGGCGCACCGCTACAACAACCCACTGACGTGGGAGTTCTCGAGCAATCGCGCTGATGCGCCTATGGCACCTCTGCCACCCCGTCGGCGGCAAGATGGCTACGAGAATCATGTAT 840  
S G A H R Y N N P L T W E F S S N L A L M R L W H L C H P V G G K M A Y E N M Y  
CTGCCGACTGGGGAATGCCGTAACTGTCTGTGACGAGAAGCTCACGAACCGCAGCGGGGCAACGGAGAAGCGCTACCACGGCGGCTTCTGGTTCCGCGCCCAATGACCCGATCGAA 960  
L P D W A N A A N V C D Q N V T N R S G A T E K R Y H G G F W F R A S N D P I E  
GTCGGGCGCATCATGGACGAAGCGCGCGAGATCGTTGTCTACGAGCGCGCCGACGGAAGATCGCGCTCCATGCCGCTGAGTTCTGTCGCGCCGATGTGCGGCTGGAGGCCAAGAGCATC 1080  
V G R I M D E A A E I V V Y E R A D G K I G V H A G E F V A P D V R L E A K S I  
TACAGCATCCGCGTCGACAAGAATAAGCGCGCGCGAACACTGTGCTTGGCGTGCAGCGCGGTACGTCAATACGGCCAAGGACTACATCACTGAAGACGCCGCGATATACGGCGACCCG 1200  
Y S I R V D K N K R R A N T V L G V R G R Y V N T A K D Y I T E D A A I Y G D P  
TATGTGTCTGTCGACGACGACGACGCGGACGCGCGGACCTTCGACAATGCGGCAATCCAGAGCCACAACACTGCCAGCGCAAGCAGAAGTTGACGTTTGTAGGGCGAAGCGCTCGCGCG 1320  
Y A V V D D S T E R T R T F D N A A I Q S H N H C Q R K Q K L T F V R A N A R R  
GTCTCGGTGGTTCGGGACTACACGGCAGACGGCGTTAGGATATCCCTTACCGCGCTTCGTGACGGTGACATACCCTAGCCGGGGGTGGCCGAAGCCGTTGTTGAAATCACATCGAGC 1440  
V S V V A D Y T A D G V R D I P Y R R F V T V H Y P S R G L A E A V V E I T S S  
GTGACGATTGATTCGCGCAACATCGCATTTCTCTCCGCTTATCGTGTCCAGCGGCTGTACGCCCTTCAACGCCGCAACGGAGGAGGGCGAGCCTGGCGAGTCCGTCGAGCCATTG 1560  
V T I D L R N M R I S F S G I I V S P S L Y A F N A A T E E G E P G E S V E P L  
CCCGATGAGGGCGTCCCGTCCCGACGGGCTTCGTTCCGACGATCCAAACGGAAGTCGTTTCTGGCGCGCCACGGCGGCATTTCATCAATGCGACGTGGACCTTCGTCGACGACGCGTG 1680  
P D E G V P V P T G F V P T I Q T E V V S G G A T A A F I N A T W T F V D D T L  
ACTTACGAGCTCGAATACGACCGCACGCGGCTCGACGGCGTGCAGTCGGTGTTCAGTTGCTGGCGATACGAGGTTTCGTTCCGGCTATCTCGTCGACGCGAGGAATACCGCGTC 1800  
T Y E L E Y D R T S G S T G V Q S V F S V A G D T Q V R S G Y L V D G E E Y R V  
AGGCTGAGAGCATGGGGCGGCGGACGAAGTCGAGTGGACCGATTACGTGCTTCTGACTGCTACGGCGGATCCGGTTGCGCCGGGGGCTGTTACGGCGGTCAGCGTGGATGTGTCGACG 1920  
R L R A W G G G T K S E W T D Y V L L T A T A D P V A P G A V T A V S V D V S T  
CCGCTGAAGCGAGTTTGGCTGGACCGCGCGAACAGCGCCAACTACTTCGCCTGCCGCATTACATCAACACCGTCGACAACCTGGGAACGGCAACGCTCGCGGCGACCGAATACGGG 2040  
P S E A E F G W T A P N S A N Y F 15738 I Y I N T V D N L G T A T L A A T E Y G  
CCGCTAGCGGACCGACTTGGCGCTCGTCACGTGCTCGCTCGCGCGGACCTATTACGGCTGGCTTCGGTCGATCAACCCATCTGGCATCGCCGGTACGGCGGTAGCGACTGGGGCGTTT 2160  
P P S A T D L R V V T S L A A G T Y Y G W L R S I N P S G I A G T A V A T G A F  
GTGTCGACGTAAcgcacccgcgcagacacacaatctggattttgcagcccgccctcgcgcggtttttttttacatggagcaagcat 2248  
V V T . R H P P T A Q S G F C S P P S R G L F L Y M E Q A

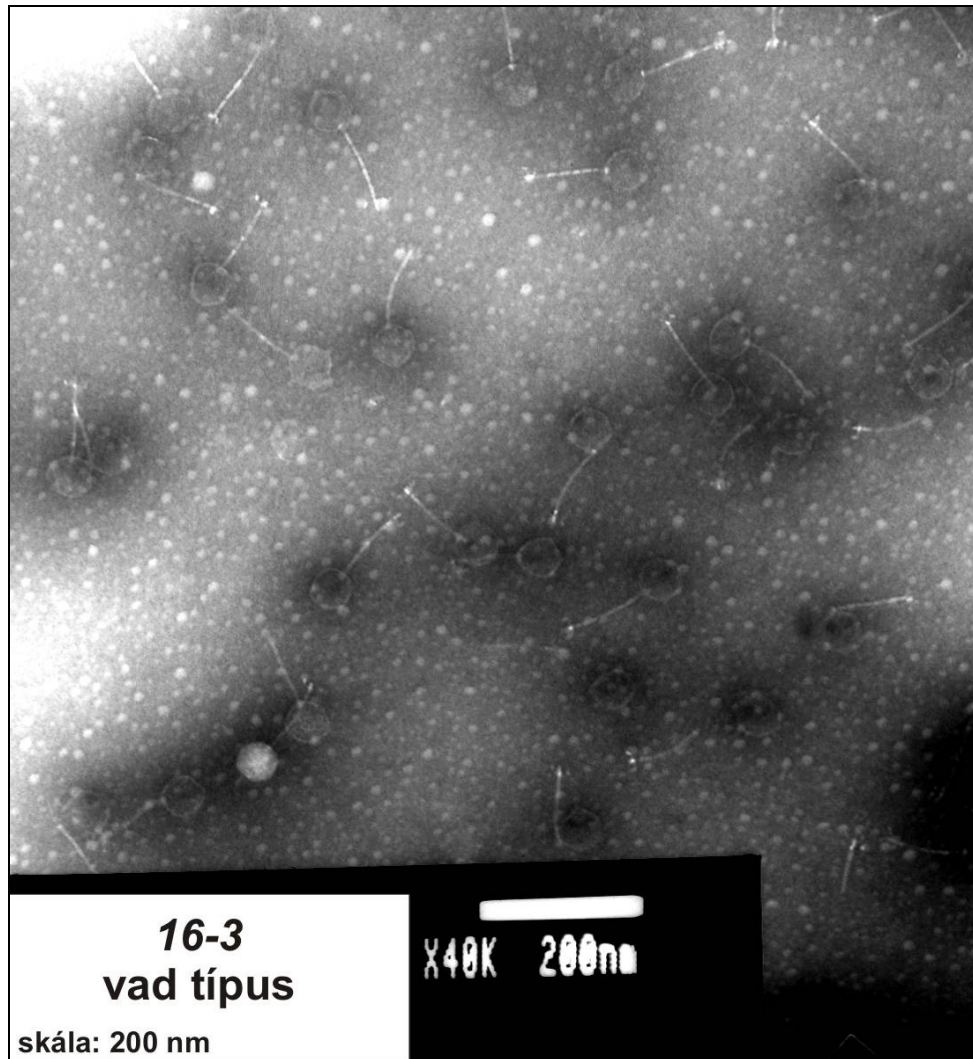


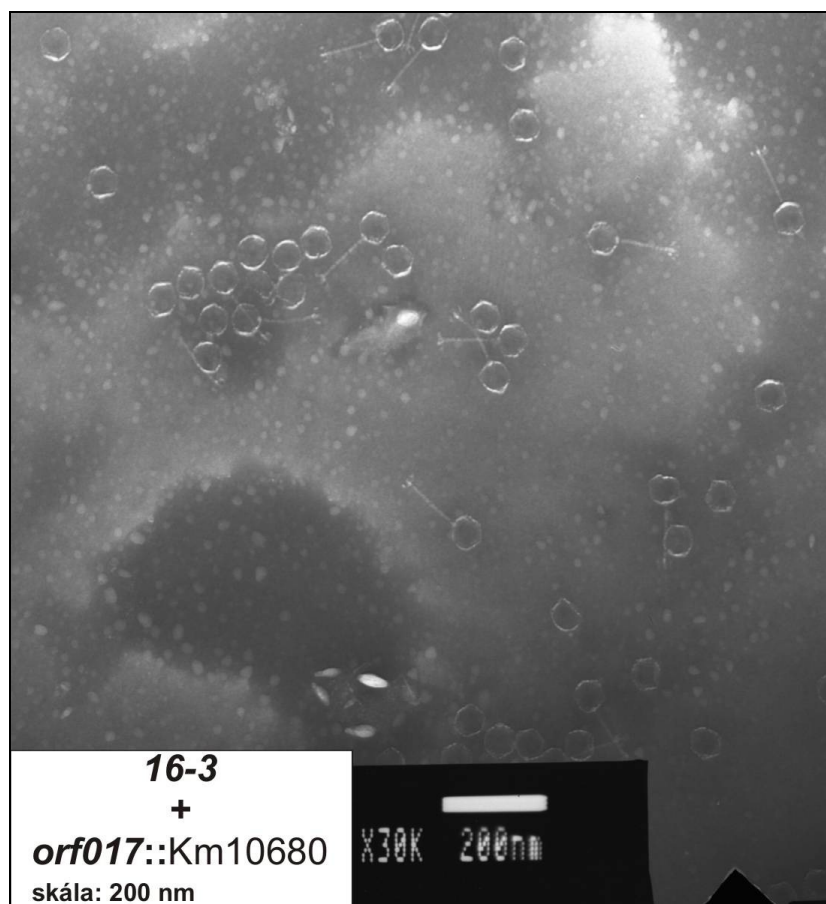
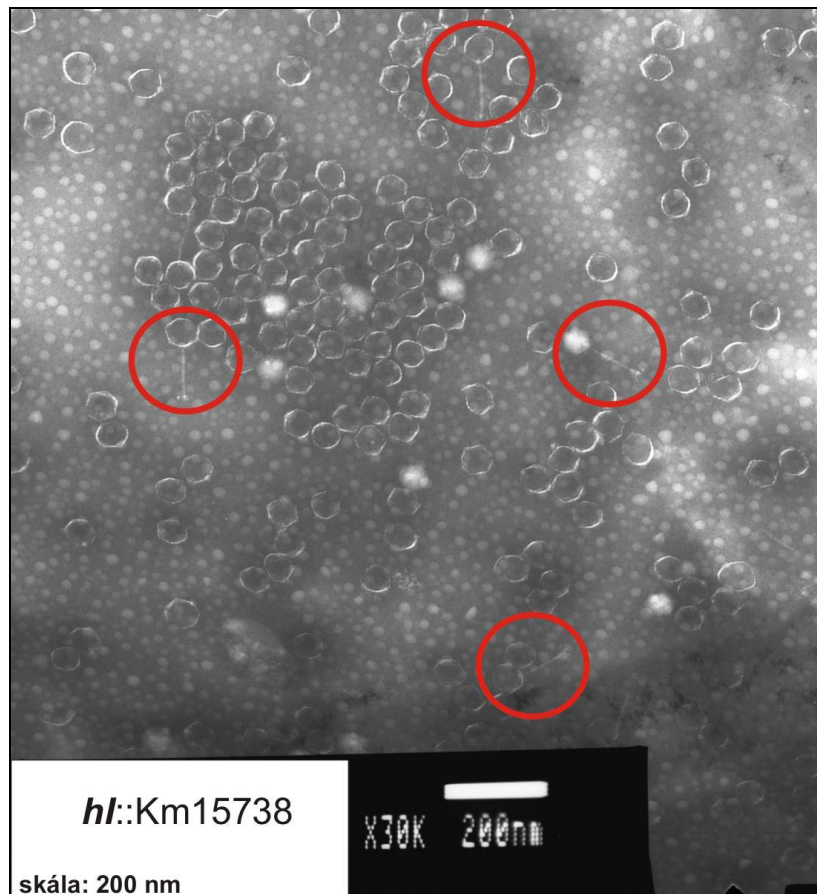
## orf hII

ATGGCCATCACCGCAGCAGAGGCCCTCCCGACTACGAACTGATGGTGTGCCGTGCTCTGGGTCGCATAAGATTAAAAAGCGACATGCGCAATTGGGGCGCATGGGTCGAAGGGCTA	120
M A I T A A E A F R D Y E T D G V P S S G S H K I K K S D M R N W G A W V E G L	
ATCAGCGCCTTTACCGCAAACGGCGGGCTAATCTTCTCGAGCAAGGCAACGCTCGACGCCAACCTTGCTTATGCCGCCAATACCATGGCGTGGGTCAATTGGTGACGCGACGGCCGCGAAT	240
I S A F T A N G G L I F S S K A T L D A N L A Y A A N T M A W V I G D A T A A N	
AACGGCGCTATGGCAAGGTCGGTGCCTCTGGTCTGGATCGTGGACCGCGCGCGGACCTGCCGTTCACTTCATCATCGCATCGGACGTCGGCGCCGGCACTCCGAACGCCATTAG	360
N G V Y G K V G A S G S G S W T R R A D L P F S F I I A S D V G A G T P N A I Q	
GCGACGACGACCATTCGGGTGTCGGGTCTGCCCTCGTCTGGATGAACATCTTTGAGGCCAATACTGCAAGCCCGGTCACTGTGACGTTCAACGGCGCGCTGCACTCACGGTCAAGACT	480
A T T T I P V S G S A L V W M N I F E A N T A S P V T V S F N G G A A L T V K T	
AACGCTGGAAATGACGTCGGGTGCGGGTTTGACTCCCGCATGATCGTCATGGCATCGTTTCGGGATCGACGTTCCGACTGGTGAGCGATCAGGCTAGCGCTGCGATTGTTGCGGCC	600
N A G N D V A V G G L T P G M I V M G I V S G S T F R L V S D Q A S A A I V A A	
GCAAGGCGAGCCAGGTTGCGGTGAAGCTGCGCAGGCAAGCGAGGCGGGCGCCTCGAGCGCGAATATTCCGACGCTGACACTCGTACTGGCTCAAGGCGTACAAACCGCTCGTG	720
A E A A Q V A A E A A Q A A A E A A A S S A N I R H A D T R T A L K A Y N T V V	
ACCAAGTTGCGCTTCTAGGGGAAGCGGGCGCAAGGTCTTTTCAGTGGATGGCGGGCACTACTCCACCTACATCGCGCGGATACGGGTGAAGGCGTTTTCATCAAGGCGCAGCT	840
T K L A F L G E G G R E G L F E W M A G D Y S T Y I A A D T A E G V F I K A D A	
ATTGCTCTACTGCTGGCGCCTGGGTGCGGCTTATGACGAACGGATGTTCCGCTGGTTGGTGTCTGGGCGATGGTCCGACGCCACATCCGAATCTCTGCGGCAATCTCATTGGCG	960
I A S T A G A W V R V Y D E L D V R W F G A V G D G S D A T S E F S A A I S L A	
CTGTTTCTCGGTTAAACAAGGTCGTTTGTCTATGCAACCAAGCAATTCAAACCTTGTTGAATTAGAAATCCCGGCTCAATCGAAATCGATATGGGCGGGCCACACTACTGGCGAT	1080
L F L G L N K V V C H D A T K Q F K L V E L E I P G S I E I D M G G A T L L A D	
TTCAACAACCTTATACACGCAAACTTGCGCAACGATCCTGACAGTAGCACGGAAGCGAAGCGATTGACGCTCAGGATTCGCCACGCCGTGATTGATGGGCAAAACGACGGGACAAACGCT	1200
F N N L Y T Q T C A T I L Q T S T E A N A F D V T I R H A V I D G Q N D G T N A	
TCGGGTTTCGGCGCGCCCTCTCTAGACTTCAAGGCGCGCGCAATCGAAGTGGACCATTCGCGCTTAAAGGGGTGCCAATCGAGGGCCAGGCGCCACTGTTAGCTATTTTCGACGGC	1320
S G F G G R P L L D F K G G A I E L D H C V V K R G A N R G P G A T V S Y F D G	
ACACAGGGGGAATTCATGCAAGAAGACCCCACTCGCGTTTACATCCACTACTGCGAATTTGGAGCGAGCCCCGGCGAACAGGTTTACATTTCTCTCCAATAAAACGACAGCGATCGGTGCA	1440
T Q G E I Q C K N P T R V Y I H H C E I G A S P G E Q V H I L S N K T T A I G R	
CCCGTCGCTGTTATCGAGCATTCGCGTTTATAAGGATAGACTTTGGGATCCGGGTACTTTATGGTCTTCTTCTCGTGGTGTATCTACAACATGCACCAAAAACAGCTATATGGCGGAC	1560
P V V V I E H C R F Y K D R L W D P G T Y W S S S 17526 V I Y N C T K T S Y M A D	
TGCCAGTTTGAACAGCATATCAAAATCCGCGTGAATTGGTTCGGTCCAGGACGATCGAGCGTTGCCAGTTTCCGGTGTGTGCGACAGCCAAGCAATTGACTTTGACGAAGCTGCATCT	1680
C Q F E Q H I K S A V N W F G P G T I E R C Q F S G V S D S Q A I D F D E A A S	
TTTGGCATCGACAGGTCATCTGCGGGACTGTTTTTCCAGAACGTTATCGCGGGTACGCTGTGCGCGCATCGTCCGTCACGAGTTCTAGAGAATCTGGACATCAATCGGTGCCAG	1800
F G I D Q V T V R D C F F Q N V I G G Y A V R A S C R H A V L E N L D I N R C Q	
AACGGCATTTCATCATGCAAGTGCAGGGAACGACGCCATCGTCTTCTCTGCGGTTGGTGCAGACACCCCTCGATCAATGTACAACGTATTATGCGCAACATCACCGGGAACGGGAATGAG	1920
N G I Y I E V Q Q T T P S V F S G V G A Q T P R S M Y N V F M R N I T G N G N E	
GTCCAGACGCTGCGGGGCGGCGAGTACTAATACCCGATAAAGGTCAAAGGTCTCGACACGACTAATCCGGCGAAGGTGTACATCGAGGGCACCGGCAACCATCAGCATTCGACCGGT	2040
V P D G A G A A V T N T L I K V K G L D Q T N P A N V Y I E G T G N H Q H S T G	
GGAGATTTCGCGAGCGCTAACGAAGAGTATGGTATCGACATTGAGAATTGCTATCTGTTCTGCGAGGGCGTTTCGCTCATGGCGGACTTCGAAGGTGAGATGGCGGGCATAGCAAA	2160
G D F P S A N E E Y G I D I E N C Y L F L R G A F A H G A T S K V R M A G H S K	
TTCAAGGCGCGGATTCGCAAGTTTCTTGAGAGGAGCGTCTAATCTGCTGACAGTGAACGGAGGACGCGTGCCTGACATTGTTTTCGAAGACTGCGAGACAAAGAAAATCTTGGACC	2280
F K A A D C Q F F L R G A S N L L T V N G G T V R D I V F 48260 E T K E N S W T	
GGAAACACGTGCGCTTCTTGAGCGCCCCACAATGAGCGGTCTGCTACCGCACTCGCGCGGGGAGATCGATGTGACAGACGCGGCATTCCCTACACTACGAATTATACGACAACC	2400
G K H V A F L S A P T M S G R L Y R T R A G D I D V T D A G I P Y T T N Y T T T	
GGCACAACCTGA	2412
G T T .	

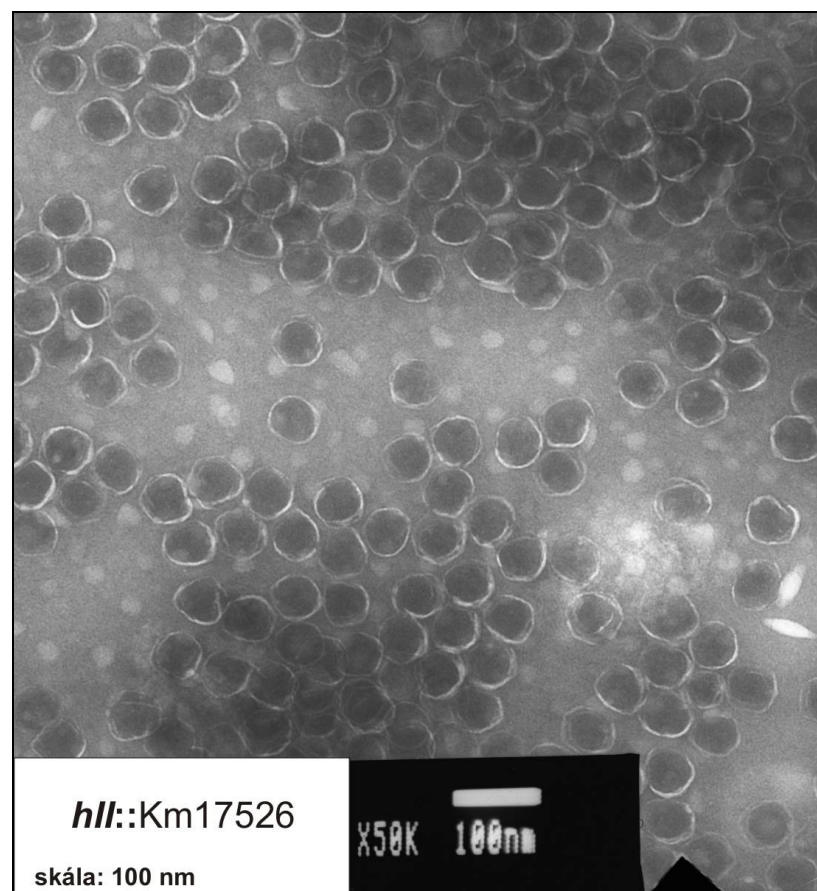
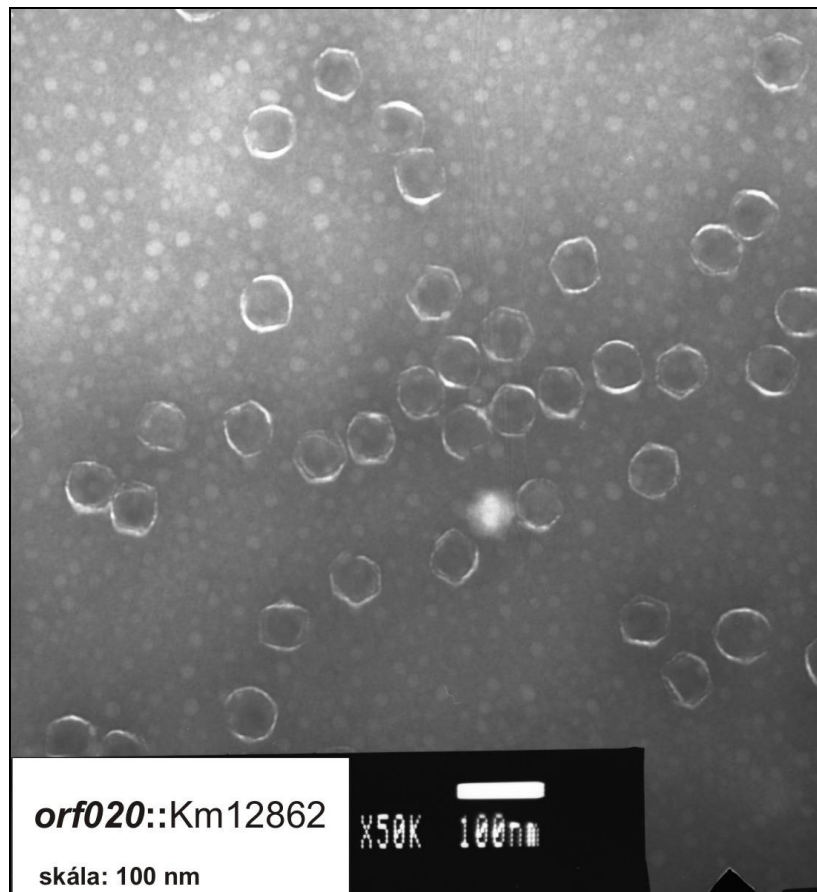
**2. melléklet: Elektronmikroszkópos felvételek a 16-3 vad és néhány inszerciós mutáns fágról**

A *hI::Km15738* felvételen a piros karikák jelölik a kis arányban képződő farokkal rendelkező fágészecskéket. A vad és egy farok nélküli mutáns fágizátum körülbelül 1:1 arányú keverékének (*16-3 + orf017::Km10680* fotó) együttes vizsgálata mutatja, hogy a farok nélküli fágfejek a vad fágfejekkel egyforma morfológiájúak.









## 11. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- Ackermann, H. W., Azizbekyan, R. R., Bernier, R. L., de Barjac, H., Saindoux, S., Valero, J. R. and Yu, M. X. (1995) Phage typing of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis*. *Res Microbiol*, 146, 643-657.
- Blaha, B., Semsey, S., Ferenczi, S., Csiszovszki, Z., Papp, P. P. and Orosz, L. (2004) A proline tRNA(CGG) gene encompassing the attachment site of temperate phage 16-3 is functional and convertible to suppressor tRNA. *Mol Microbiol*, 54, 742-754.
- Bonhivers, M., Ghazi, A., Boulanger, P. and Letellier, L. (1996) FhuA, a transporter of the *Escherichia coli* outer membrane, is converted into a channel upon binding of bacteriophage T5. *EMBO J*, 15, 1850-1856.
- Bradbeer, C., Woodrow, M. L. and Khalifah, L. I. (1976) Transport of vitamin B12 in *Escherichia coli*: common receptor system for vitamin B12 and bacteriophage BF23 on the outer membrane of the cell envelope. *J Bacteriol*, 125, 1032-1039.
- Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J. and Berger, B. (2001) BETAWRAP: successful prediction of parallel beta -helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14819-14824.
- Braun, V. (1995) Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol Rev*, 16, 295-307.
- Bremer, E., Middendorf, A., Martinussen, J. and Valentin-Hansen, P. (1990) Analysis of the *tsx* gene, which encodes a nucleoside-specific channel-forming protein (Tsx) in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Gene*, 96, 59-65.
- Brussow, H. and Hendrix, R. W. (2002) Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, 108, 13-16.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987) X11-Blue: a high efficiency plasmid transforming *RecA*. *Es. BioTechniques*, 5, 376-379.
- Cadieux, N., Bradbeer, C. and Kadner, R. J. (2000) Sequence changes in the ton box region of BtuB affect its transport activities and interaction with TonB protein. *J Bacteriol*, 182, 5954-5961.
- Charbit, A., Werts, C., Michel, V., Klebba, P. E., Quillardet, P. and Hofnung, M. (1994) A role for residue 151 of LamB in bacteriophage lambda adsorption: possible steric effect of amino acid substitutions. *J Bacteriol*, 176, 3204-3209.
- Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., Marvin-Guy, L., Rami-Shojaei, S. and Brussow, H. (2004) *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family Myoviridae. *J Bacteriol*, 186, 7069-7083.
- Click, E. M. and Webster, R. E. (1997) Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. *J Bacteriol*, 179, 6464-6471.
- Csiszovszki, Z., Buzas, Z., Semsey, S., Ponyi, T., Papp, P. P. and Orosz, L. (2003) *immX* immunity region of rhizobium phage 16-3: two overlapping cistrons of repressor function. *J Bacteriol*, 185, 4382-4392.
- Dallmann, G., Marincs, F., Papp, P., Gaszner, M. and Orosz, L. (1991) The isolated N-terminal DNA binding domain of the *c* repressor of bacteriophage 16-3 is functional in DNA binding in vivo and in vitro. *Mol Gen Genet*, 227, 106-112.
- Dallmann, G., Orosz, L. and Sain, B. (1979) Restriction mapping of DNA of temperate *Rhizobium meliloti* phage 16-3: comparison of genetic and physical maps indicates a long, genetically silent chromosomal arm. *Mol Gen Genet*, 176, 439-448.
- Dallmann, G., Papp, P. and Orosz, L. (1987) Related repressor specificity of unrelated phages. *Nature*, 330, 398-401.



- Deak, V., Lukacs, R., Buzas, Z., Palvolgyi, A., Papp, P. P., Orosz, L. and Putnoky, P. (2010) Identification of tail genes in the temperate phage 16-3 of *Sinorhizobium meliloti* 41. *J Bacteriol*, 192, 1617-1623.
- Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M. C. and Moineau, S. (2006) Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl Environ Microbiol*, 72, 4338-4346.
- Dorgai, L., Olasz, F., Berenyi, M., Dallmann, G., Pay, A. and Orosz, L. (1981) Orientation of the genetic and physical map of *Rhizobium meliloti* temperate phage 16-3. *Mol Gen Genet*, 182, 321-325.
- Dorgai, L., Polner, G., Jonas, E., Garamszegi, N., Ascher, Z., Pay, A., Dallmann, G. and Orosz, L. (1983) The detailed physical map of the temperate phage 16-3 of *Rhizobium meliloti* 41. *Mol Gen Genet*, 191, 430-433.
- Erdei, S., Dudas, B., Orosz, L. and Duda, E. (1982) Identification of structural proteins of *Rhizobium meliloti* temperate phage 16-3. *J Gen Virol*, 62 (Pt 1), 145-152.
- Forsberg, L. S. and Reuhs, B. L. (1997) Structural characterization of the K antigens from *Rhizobium fredii* USDA257: evidence for a common structural motif, with strain-specific variation, in the capsular polysaccharides of *Rhizobium* spp. *J Bacteriol*, 179, 5366-5371.
- Fraser, J. S., Yu, Z., Maxwell, K. L. and Davidson, A. R. (2006) Ig-like domains on bacteriophages: a tale of promiscuity and deceit. *J Mol Biol*, 359, 496-507.
- Fraysse, N., Couderc, F. and Poinot, V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur J Biochem*, 270, 1365-1380.
- Ganyu, A., Csiszovszki, Z., Ponyi, T., Kern, A., Buzas, Z., Orosz, L. and Papp, P. P. (2005) Identification of cohesive ends and genes encoding the terminase of phage 16-3. *J Bacteriol*, 187, 2526-2531.
- Glazko, G., Makarenkov, V., Liu, J. and Mushegian, A. (2007) Evolutionary history of bacteriophages with double-stranded DNA genomes. *Biol Direct*, 2, 36.
- Haapa, S., Suomalainen, S., Eerikainen, S., Airaksinen, M., Paulin, L. and Savilahti, H. (1999) An efficient DNA sequencing strategy based on the bacteriophage mu in vitro DNA transposition reaction. *Genome Res*, 9, 308-315.
- Haggard-Ljungquist, E., Halling, C. and Calendar, R. (1992) DNA sequences of the tail fiber genes of bacteriophage P2: evidence for horizontal transfer of tail fiber genes among unrelated bacteriophages. *J Bacteriol*, 174, 1462-1477.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-580.
- Hancock, R. W. and Braun, V. (1976) Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of bacteriophages T1 and phi80 to *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 125, 409-415.
- Hanfling, P., Shashkov, A. S., Jann, B. and Jann, K. (1996) Analysis of the enzymatic cleavage (beta elimination) of the capsular K5 polysaccharide of *Escherichia coli* by the K5-specific coliphage: reexamination. *J Bacteriol*, 178, 4747-4750.
- Hashemolhosseini, S., Stierhof, Y. D., Hindennach, I. and Henning, U. (1996) Characterization of the helper proteins for the assembly of tail fibers of coliphages T4 and lambda. *J Bacteriol*, 178, 6258-6265.
- Heilpern, A. J. and Waldor, M. K. (2000) CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the tolQRA gene products. *J Bacteriol*, 182, 1739-1747.
- Heller, K. J. and Schwarz, H. (1985) Irreversible binding to the receptor of bacteriophages T5 and BF23 does not occur with the tip of the tail. *J Bacteriol*, 162, 621-625.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.

- Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res*, 9, 2989-2998.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. and Walker, G. C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol*, 5, 619-633.
- Kannenberg, E. L. and Brewin, N. J. (1994) Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. *Trends Microbiol*, 2, 277-283.
- Katsura, I. (1987) Determination of bacteriophage lambda tail length by a protein ruler. *Nature*, 327, 73-75.
- Katsura, I. (1990) Mechanism of length determination in bacteriophage lambda tails. *Adv Biophys*, 26, 1-18.
- Katsura, I. and Hendrix, R. W. (1984) Length determination in bacteriophage lambda tails. *Cell*, 39, 691-698.
- Kenny, J. G., McGrath, S., Fitzgerald, G. F. and van Sinderen, D. (2004) Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity. *J Bacteriol*, 186, 3480-3491.
- Kereszt, A., Kiss, E., Reuhs, B. L., Carlson, R. W., Kondorosi, A. and Putnoky, P. (1998) Novel rkp gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the rkpK gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. *J Bacteriol*, 180, 5426-5431.
- Kiino, D. R., Licudine, R., Wilt, K., Yang, D. H. and Rothman-Denes, L. B. (1993a) A cytoplasmic protein, NfrC, is required for bacteriophage N4 adsorption. *J Bacteriol*, 175, 7074-7080.
- Kiino, D. R., Singer, M. S. and Rothman-Denes, L. B. (1993b) Two overlapping genes encoding membrane proteins required for bacteriophage N4 adsorption. *J Bacteriol*, 175, 7081-7085.
- Kiss, E., Kereszt, A., Barta, F., Stephens, S., Reuhs, B. L., Kondorosi, A. and Putnoky, P. (2001) The rkp-3 gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure. *Mol Plant Microbe Interact*, 14, 1395-1403.
- Kiss, E. and Kondorosi, A. (1997) Complete sequence of a *Rhizobium* plasmid carrying genes necessary for symbiotic association with the plant host. *BioEssays*, 19, 843-846.
- Kiss, E., Reuhs, B. L., Kim, J. S., Kereszt, A., Petrovics, G., Putnoky, P., Dusha, I., Carlson, R. W. and Kondorosi, A. (1997) The rkpGHI and -J genes are involved in capsular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 179, 2132-2140.
- Kiss, G. B., Dobo, K., Dusha, I., Breznovits, A., Orosz, L., Vincze, E. and Kondorosi, A. (1980) Isolation and characterization of an R-prime plasmid from *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 141, 121-128.
- Koebnik, R. (1999) Structural and functional roles of the surface-exposed loops of the beta-barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 181, 3688-3694.
- Koebnik, R. (2001) The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends Microbiol*, 9, 586-590.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd and Peterson, K. M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175-176.
- Lagares, A., Caetano-Anolles, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H. D., Puhler, A. and Favelukes, G. (1992) A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J Bacteriol*, 174, 5941-5952.
- Leigh, J. A. and Walker, G. C. (1994) Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet*, 10, 63-67.

- LeVier, K., Phillips, R. W., Grippe, V. K., Roop, R. M., 2nd and Walker, G. C. (2000) Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science*, 287, 2492-2493.
- Likhacheva, N. A., Samsonov, V. V. and Sineoky, S. P. (1996) Genetic control of the resistance to phage C1 of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 178, 5309-5315.
- Loessner, M. J., Inman, R. B., Lauer, P. and Calendar, R. (2000) Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol Microbiol*, 35, 324-340.
- Lu, M. J. and Henning, U. (1994) Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends Microbiol*, 2, 137-139.
- Lucchini, S., Desiere, F. and Brussow, H. (1998) The structural gene module in *Streptococcus thermophilus* bacteriophage phi Sfi11 shows a hierarchy of relatedness to Siphoviridae from a wide range of bacterial hosts. *Virology*, 246, 63-73.
- Mc Grath, S., Neve, H., Seegers, J. F., Eijlander, R., Vegge, C. S., Brondsted, L., Heller, K. J., Fitzgerald, G. F., Vogensen, F. K. and van Sinderen, D. (2006) Anatomy of a lactococcal phage tail. *J Bacteriol*, 188, 3972-3982.
- Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T. and Ruger, W. (2003) Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 86-156, table of contents.
- Montag, D., Schwarz, H. and Henning, U. (1989) A component of the side tail fiber of *Escherichia coli* bacteriophage lambda can functionally replace the receptor-recognizing part of a long tail fiber protein of the unrelated bacteriophage T4. *J Bacteriol*, 171, 4378-4384.
- Morita, M., Fischer, C. R., Mizoguchi, K., Yoichi, M., Oda, M., Tanji, Y. and Unno, H. (2002) Amino acid alterations in Gp38 of host range mutants of PP01 and evidence for their infection of an ompC null mutant of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett*, 216, 243-248.
- Morona, R., Kramer, C. and Henning, U. (1985) Bacteriophage receptor area of outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 164, 539-543.
- Nelson, D., Schuch, R., Zhu, S., Tscherne, D. M. and Fischetti, V. A. (2003) Genomic sequence of C1, the first streptococcal phage. *J Bacteriol*, 185, 3325-3332.
- Nimmich, W., Krallmann-Wenzel, U., Muller, B. and Schmidt, G. (1992) Isolation and characterization of bacteriophages specific for capsular antigens K3, K7, K12, and K13 of *Escherichia coli*. *Zentralbl Bakteriell*, 276, 213-220.
- Olasz, F., Dorgai, L., Papp, P., Kosa, E. and Orosz, L. (1985) On the site-specific recombination of phage 16-3 of *Rhizobium meliloti*: identification of genetic elements and att recombinations *Mol Gen Genet*, 201, 289-295.
- Oppenheim, A. B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D. L. and Adhya, S. (2005) Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet*, 39, 409-429.
- Orosz, L., Pay, A. and Dallmann, G. (1980) Heterozygosis of phage 16-3 of *Rhizobium meliloti*: moderate level of mismatch repair or gene conversion. *Mol Gen Genet*, 179, 163-167.
- Orosz, L. and Sik, T. (1970) Genetic mapping of rhizobiophage 16-3. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 17, 185-194.
- Orosz, L., Svab, Z., Kondorosi, A. and Sik, T. (1973) Genetic studies on rhizobiophage 16-3. I. Genes and functions on the chromosome. *Mol Gen Genet*, 125, 341-350.
- Palvolgyi, A., Deak, V., Poinso, V., Nagy, T., Nagy, E., Kerepesi, I. and Putnok, P. (2009) Genetic analysis of the rkp-3 gene region in *Sinorhizobium meliloti* 41: rkpY directs capsular polysaccharide synthesis to KR5 antigen production. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1422-1430.

- Papp, I., Dorgai, L., Papp, P., Jonas, E., Olasz, F. and Orosz, L. (1993) The bacterial attachment site of the temperate *Rhizobium* phage 16-3 overlaps the 3' end of a putative proline tRNA gene. *Mol Gen Genet*, 240, 258-264.
- Papp, P. P. and Iyer, V. N. (1995) Determination of the binding sites of RepA, a replication initiator protein of the basic replicon of the IncN group plasmid pCU1. *J Mol Biol*, 246, 595-608.
- Papp, P. P., Nagy, T., Ferenczi, S., Elo, P., Csiszovszki, Z., Buzas, Z., Patthy, A. and Orosz, L. (2002) Binding sites of different geometries for the 16-3 phage repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8790-8795.
- Pellock, B. J., Cheng, H. P. and Walker, G. C. (2000) Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol*, 182, 4310-4318.
- Petrovics, G., Putnoky, P., Reuhs, B., Kim, J., Thorp, T. A., Noel, K. D., Carlson, R. W. and Kondorosi, A. (1993) The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol Microbiol*, 8, 1083-1094.
- Petter, J. G. and Vimr, E. R. (1993) Complete nucleotide sequence of the bacteriophage K1F tail gene encoding endo-N-acetylneuraminidase (endo-N) and comparison to an endo-N homolog in bacteriophage PK1E. *J Bacteriol*, 175, 4354-4363.
- Piuri, M. and Hatfull, G. F. (2006) A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. *Mol Microbiol*, 62, 1569-1585.
- Plisson, C., White, H. E., Auzat, I., Zafarani, A., Sao-Jose, C., Lhuillier, S., Tavares, P. and Orlova, E. V. (2007) Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J*, 26, 3720-3728.
- Putnoky, P., Deak, V., Bekasi, K., Palvolgyi, A., Maasz, A., Palagyi, Z., Hoffmann, G. and Kerepesi, I. (2004) H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol*, 186, 1591-1597.
- Putnoky, P., Grosskopf, E., Ha, D. T., Kiss, G. B. and Kondorosi, A. (1988) *Rhizobium* fix genes mediate at least two communication steps in symbiotic nodule development. *J Cell Biol*, 106, 597-607.
- Putnoky, P. and Kondorosi, A. (1986) Two gene clusters of *Rhizobium meliloti* code for early essential nodulation functions and a third influences nodulation efficiency. *J Bacteriol*, 167, 881-887.
- Putnoky, P., Petrovics, G., Kereszt, A., Grosskopf, E., Ha, D. T., Banfalvi, Z. and Kondorosi, A. (1990) *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J Bacteriol*, 172, 5450-5458.
- Randall-Hazelbauer, L. and Schwartz, M. (1973) Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 116, 1436-1446.
- Reuhs, B. L., Carlson, R. W. and Kim, J. S. (1993) *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175, 3570-3580.
- Reuhs, B. L., Relic, B., Forsberg, L. S., Marie, C., Ojanen-Reuhs, T., Stephens, S. B., Wong, C. H., Jabbouri, S. and Broughton, W. J. (2005) Structural characterization of a flavonoid-inducible *Pseudomonas aeruginosa* A-band-like O antigen of *Rhizobium* sp. strain NGR234, required for the formation of nitrogen-fixing nodules. *J Bacteriol*, 187, 6479-6487.

- Reuhs, B. L., Williams, M. N., Kim, J. S., Carlson, R. W. and Cote, F. (1995) Suppression of the Fix<sup>-</sup> phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J Bacteriol*, 177, 4289-4296.
- Rivera, M., Chivers, T. R., Lam, J. S. and McGroarty, E. J. (1992) Common antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* AK1401 as a receptor for bacteriophage A7. *J Bacteriol*, 174, 2407-2411.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sao-Jose, C., Baptista, C. and Santos, M. A. (2004) *Bacillus subtilis* operon encoding a membrane receptor for bacteriophage SPP1. *J Bacteriol*, 186, 8337-8346.
- Schneider, H., Fsihi, H., Kottwitz, B., Mygind, B. and Bremer, E. (1993) Identification of a segment of the *Escherichia coli* Tsx protein that functions as a bacteriophage receptor area. *J Bacteriol*, 175, 2809-2817.
- Scholl, D., Rogers, S., Adhya, S. and Merrill, C. R. (2001) Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J Virol*, 75, 2509-2515.
- Semsey, S., Blaha, B., Koles, K., Orosz, L. and Papp, P. P. (2002) Site-specific integrative elements of rhizobiophage 16-3 can integrate into proline tRNA (CGG) genes in different bacterial genera. *J Bacteriol*, 184, 177-182.
- Semsey, S., Papp, I., Buzas, Z., Patthy, A., Orosz, L. and Papp, P. P. (1999) Identification of site-specific recombination genes *int* and *xis* of the *Rhizobium* temperate phage 16-3. *J Bacteriol*, 181, 4185-4192.
- Shao, Z., Lin, R. T. and Newman, E. B. (1994) Sequencing and characterization of the *sdaC* gene and identification of the *sdaCB* operon in *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem*, 222, 901-907.
- Sharypova, L. A., Chataigne, G., Frayse, N., Becker, A. and Poinot, V. (2006) Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Glycobiology*, 16, 1181-1193.
- Shibata, Y., Yamashita, Y. and van der Ploeg, J. R. (2009) The serotype-specific glucose side chain of rhamnose-glucose polysaccharides is essential for adsorption of bacteriophage M102 to *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*, 294, 68-73.
- Siponen, M., Spinelli, S., Blangy, S., Moineau, S., Cambillau, C. and Campanacci, V. (2009) Crystal structure of a chimeric receptor binding protein constructed from two lactococcal phages. *J Bacteriol*, 191, 3220-3225.
- Skurnik, M., Venho, R., Toivanen, P. and al-Hendy, A. (1995) A novel locus of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 involved in lipopolysaccharide outer core biosynthesis. *Mol Microbiol*, 17, 575-594.
- Szende, K. and Ördögh, F. (1960) Die lysogenie von *Rhizobium meliloti*. *Naturwissenschaften*, 47, 404-405.
- Thatte, V., Gill, S. and Iyer, V. N. (1985) Regions on plasmid pCU1 required for the killing of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*, 163, 1296-1299.
- Tomlinson, S. and Taylor, P. W. (1985) Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide. *J Virol*, 55, 374-378.
- Vegge, C. S., Brondsted, L., Neve, H., Mc Grath, S., van Sinderen, D. and Vogensen, F. K. (2005) Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J Bacteriol*, 187, 4187-4197.

- Vegge, C. S., Vogensen, F. K., Mc Grath, S., Neve, H., van Sinderen, D. and Brondsted, L. (2006) Identification of the lower baseplate protein as the antireceptor of the temperate lactococcal bacteriophages TP901-1 and Tuc2009. *J Bacteriol*, 188, 55-63.
- Wang, J., Hofnung, M. and Charbit, A. (2000) The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to LamB, its receptor at the surface of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 182, 508-512.
- Wang, J., Michel, V., Hofnung, M. and Charbit, A. (1998) Cloning of the J gene of bacteriophage lambda, expression and solubilization of the J protein: first in vitro studies on the interactions between J and LamB, its cell surface receptor. *Res Microbiol*, 149, 611-624.
- Weigele, P. R., Scanlon, E. and King, J. (2003) Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins. *J Bacteriol*, 185, 4022-4030.
- Werts, C., Michel, V., Hofnung, M. and Charbit, A. (1994) Adsorption of bacteriophage lambda on the LamB protein of *Escherichia coli* K-12: point mutations in gene J of lambda responsible for extended host range. *J Bacteriol*, 176, 941-947.
- Wietzorrek, A., Schwarz, H., Herrmann, C. and Braun, V. (2006) The genome of the novel phage Rtp, with a rosette-like tail tip, is homologous to the genome of phage T1. *J Bacteriol*, 188, 1419-1436.
- Williams, M. N., Hollingsworth, R. I., Klein, S. and Signer, E. R. (1990) The symbiotic defect of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants is suppressed by *lpsZ+*, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol*, 172, 2622-2632.
- Yoder, M. D., Keen, N. T. and Jurnak, F. (1993) New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science*, 260, 1503-1507.
- Yu, S., Ding, H., Seah, J., Wu, K., Chang, Y., Chang, K. S., Tam, M. F. and Syu, W. (1998) Characterization of a phage specific to hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and disclosure of variations in host outer membrane protein ompC. *J Biomed Sci*, 5, 370-382.
- Yu, S. L., Ko, K. L., Chen, C. S., Chang, Y. C. and Syu, W. J. (2000) Characterization of the distal tail fiber locus and determination of the receptor for phage AR1, which specifically infects *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*, 182, 5962-5968.

## 12. PUBLIKÁCIÓK

### A disszertáció alapjául szolgáló tudományos közlemények:

1. Putnoky, P., **Deák, V.**, Bekasi, K., Palvolgyi, A., Maasz, A., Palagyi, Z., Hoffmann, G. and Kerepesi, I. (2004) H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. *J Bacteriol*, 186, 1591-1597. (IF:4,146)
2. Palvolgyi, A., **Deák, V.**, Poinso, V., Nagy, T., Nagy, E., Kerepesi, I. and Putnoky, P. (2009) Genetic analysis of the rkp-3 gene region in *Sinorhizobium meliloti* 41: rkpY directs capsular polysaccharide synthesis to KR5 antigen production. *Mol Plant Microbe Interact*, 22, 1422-1430. (IF: 4,275)
3. **Deák, V.**, Lukacs, R., Buzas, Z., Palvolgyi, A., Papp, P. P., Orosz, L. and Putnoky, P. (2010) Identification of tail genes in the temperate phage 16-3 of *Sinorhizobium meliloti* 41. *J Bacteriol*, 192, 1617-1623. (IF: 3,636)

Összesített impakt faktor: **12,057**

### A disszertáció témakörében készült konferencia előadások és poszterek:

1. **Deák Veronika**, Pálvolgyi Adrienn: A kapszuláris poliszacharid bioszintézise és a 16-3 fágreceptor. XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Biológiai Szekció, Genetika Tagozat, Szeged, 2003. II. helyezés.
2. Pálvolgyi Adrienn, **Deák Veronika**, Hoffmann Gyula, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter: A kapszuláris poliszacharid bioszintézise és a 16-3 fágreceptor, V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 2003. (poszter)
3. Putnoky Péter, **Deák Veronika**, Pálvolgyi Adrienn, Békási Krisztina, Maász Anita: Baktérium – bakteriofág felismerésben részt vevő gének azonosítása, „A DNS 50 éve”- Magyar Tudományos Akadémia Pécsi Területi Bizottsága, Biológiai Szakbizottság rendezvénye, Pécs, 2003. (előadás)
4. Nagy Tibor, **Deák Veronika**, Pálvolgyi Adrienn, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter: Az *rkpRST* gének és a kapszuláris poliszacharid bioszintézis *Sinorhizobium meliloti* baktériumban, VI. Magyar Genetikai Kongresszus Eger, 2005. (poszter)
5. **Deák Veronika**, Buzás Zsuzsanna, Lukács Rita, Kalmár Balázs, Papp Péter, Orosz László, Putnoky Péter: A 16-3 rhizobiofág *h* régiójának elemzése, VII. Magyar Genetikai Kongresszus, Balatonfüred, 2007. (poszter)
6. **Deák Veronika**, Lukács Rita, Buzás Zsuzsanna, Pálvolgyi Adrienn, Papp Péter, Orosz László, Putnoky Péter: A 16-3 rhizobiofág *h* régiójának mutációs elemzése, Genetikai Műhelyek Magyarországon, 6. Minikonferencia, Szeged, 2007. (előadás)
7. Pálvolgyi Adrienn, **Deák Veronika**, Nagy Tibor, Nagy Enikő, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter: Az RkpY a Kdo homopolimer bioszintézis szupresszora *Sinorhizobium meliloti*-ban, Genetikai Műhelyek Magyarországon, 7. Minikonferencia, Szeged, 2008. (előadás)

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatomban bemutatott eredmények a Pécsi Tudományegyetem Természettudományi Karának Biológiai Intézetében, a Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszéken diákkörösként, majd doktoranduszként végzett munka gyümölcse. Hálás vagyok a tanszék összes munkatársának, hogy megfelelő háttérrel biztosítottak eredményeim eléréséhez.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Putnoky Péternek, hogy bevezetett a kutatómunka világába, és munkámat mindvégig odaadóan irányította úgy elméleti, mint gyakorlati téren.

Köszönöm Dr. Pálvölgyi Adriennek, hogy szorosan kapcsolódó témánkban segítő munkatársam volt, és hasznos ötleteivel hozzájárult a felmerülő problémák megoldásához, a részeredmények értelmezéséhez.

Köszönöm Dr. Hoffmann Gyulának és Dr. Kerepesi Ildikónak, hogy tanszékünk kiváló oktatóiként példaként álltak előttem, és kísérletes munkájukkal is hozzájárultak témám kibontakozásához.

Köszönettel tartozom Dr. Orosz Lászlónak és Dr. Papp Péternek a fágkísérletekkel kapcsolatos elméleti és technikai segítségükért.

Hálás vagyok Dr. Buzás Zsuzsannának, hogy kiváló felszereltséggel és szakmai segítséggel járult hozzá, hogy laboratóriumában végezhessem a fehérje-technikákat.

Köszönöm Dr. Gábrriel Róbertnek és Dr. Seress Lászlónak az elektronmikroszkopizálásban nyújtott segítségüket.

Köszönöm tanszékünk lelkes szakdolgozóinak, Lukács Ritának és Kalmár Balázsnak, hogy kitartó és precíz munkájukkal hozzájárultak dolgozatom eredményeihez.

Köszönet illeti a tanszékünk asszisztenseit, Miklósvári Zoltánnét, Keidl Juditot, Garai Krisztinát, valamint az MBK Genetikai Intézetének munkatársát, Törökné Sánta Csillát, hogy biztosították a kísérletek elvégzéséhez szükséges technikai háttérrel.

Köszönöm családomnak, hogy minden erejükkel támogattak, és kitartásra, munkaszeretetre neveltek.